

Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden aus den Basidiomyceten der Gattung *Psilocybe*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Felix Blei

Master of Science

Geboren am 18.01.1989 in Forst (Lausitz)

Tag der Einreichung: 29.01.2020

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Hoffmeister
Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Dr. Pierre Stallforth
Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Prof. Dr. Timo Niedermeyer
Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

Tag der Disputation: 22.07.2020

„Das könnte in Abwandlung der bekannten Goethe-Worte so ausgedrückt werden: / Wär nicht das Auge sonnenhaft, / Die Sonne könnt' es nie erblicken; / Wär' nicht im Stoff des Geistes Kraft, / Wie könnte Stoff den Geist verrücken.“

Albert Hofmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Psychotrope Pilze	1
1.1.1 Die Entdeckung des psychotropen Wirkstoffes der <i>Psilocybe</i> -Pilze	3
1.1.2 Charakteristiken der Pilzgattung <i>Psilocybe</i>	4
1.2 Pharmakologie und Chemie des Psilocybins	6
1.2.1 Physiologische und neuropsychologische Effekte von Psilocybin	6
1.2.2 Chemie des Psilocybins	9
1.3 Die Produktion von Sekundärmetaboliten in Pilzen	11
1.3.1 L-Tryptophan als Substrat für den Sekundärstoffwechsel	13
1.3.2 Postulierte Biosynthese des Psilocybins	15
1.4 β -Carbolin-Alkaloide.....	16
2. Zielsetzung.....	19
3. Publikationen.....	20
3.1 Enzymatic synthesis of psilocybin	20
3.2 Biocatalytic production of psilocybin and derivatives in L-tryptophan-synthase enhanced reactions	40
3.3 Iterative L-tryptophan methylation in <i>Psilocybe</i> evolved by subdomain duplication ...	64
3.4 Enzymatic production of 6-methylated baeocystin and psilocybin	88
3.5 Simultaneous production of psilocybin and β -carboline monoamine oxidase inhibitors in 'magic mushrooms'	107
3.6 Production options for psilocybin: Making of the magic.	124
4. Diskussion.....	132
5. Zusammenfassung.....	158
6. Abstract	159
7. Referenzen	160
8. Abkürzungsverzeichnis	173
9. Abbildungsverzeichnis.....	174
10. Publikationen.....	175
11. Eigenständigkeitserklärung	179
12. Danksagung	180

1. Einleitung

1.1 Psychotrope Pilze

Die Fruchtkörper höherer Pilze werden vom Menschen schon seit vielen tausend Jahren gesammelt und als Nahrungsmittel konsumiert. Dabei enthalten sie nicht nur wichtige Nährstoffe wie Vitamine, Mineralien oder Spurenelemente (Kalač 2009), sondern weisen auch eine Vielzahl pharmazeutisch relevanter Naturstoffe auf, manche Pilze können sogar psychotrope Wirkungen auslösen (Lindequist, Niedermeyer et al. 2005).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass schon früh genau jene Pilze der Gattung *Psilocybe* von prähistorischen Kulturen als Rauschmittel genutzt wurden. Dabei hatten die bewusstseinsweiternden Eigenschaften der *Psilocybe* Pilze einen maßgeblichen Einfluss auf die Mythologie und Religion der Menschheit. Dies lässt sich mittlerweile recht sicher aus bisherigen prähistorischen Darstellungen und immer noch existierenden, tausende Jahre alten Pilzkulten ableiten. In Abbildung 1 sind die bisher ältesten Höhlenmalereien zu sehen, welche explizit auf den Konsum der psychotrop wirksamen Pilze hinweisen.

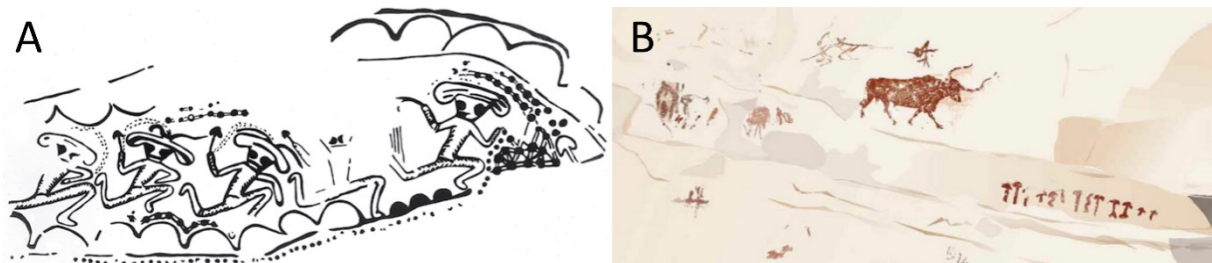


Abbildung 1: Prähistorische Darstellungen zeigen psychedelische Pilze und deren Konsum; A: Höhlenmalerei in Tassili, Algerien (Froese, Guzmán et al. 2016), B: Malerei in spanischer Höhle in Pascuala (Akers, Ruiz et al. 2011)

Die bisher ältesten Funde zum Gebrauch dieser Pilze durch den Menschen stammen aus einer Höhle in Tassili n'Ajjer in Algerien (Abbildung 1 A), welche auf ein Alter von mindestens 10.000 Jahre aus der Zeit des späten Paläolithikums geschätzt werden. Die Darstellungen werden als Zeugnis rituellen Gebrauchs psychotroper Pilze interpretiert, ersichtlich durch die gestrichelten Verbindungslinien zwischen Pilz und Kopf (Samorini 1999, Samorini 2001). Die Pilze werden der Art *Psilocybe mairei* zugeschrieben (Guzmán 2012), einer Psilocybin enthaltende Spezies, die in Afrika endemisch ist. In Europa ist der momentan älteste Hinweis für den Gebrauch von *Psilocybe* eine Wandmalerei in einer Höhle in Pascuala in Spanien, gezeigt in Abbildung 1 B, welche auf eine Zeit vor 6000 Jahren datiert werden kann (Akers,

Ruiz et al. 2011). Die in der rechten unteren Bildhälfte zu sehenden kleinen Pilze wurden aufgrund ihrer auffälligen Morphologie als *Psilocybe hispanica* identifiziert. Eine in der dortigen Region häufig vorkommende Art, welche an jener Stelle auch als erstes beschrieben wurde (Guzmán 2012).



Abbildung 2: Weitere prähistorische Darstellungen psychedelischer Pilze; A: Bronzeguss an der Eingangstür des Hildesheimer Doms, B: zum Vergleich *P. semilanceata* (Froese, Guzmán et al. 2016)

Als Beispiel der späteren Zeit ist der Bronzeguss an der Eingangstür des Hildesheimer Doms zu nennen (Abbildung 2 A). Die Arbeit entstand bereits im Mittelalter um 1015 und zeigt die Szene des Sündenfalls am Baum der Erkenntnis. Es wird vermutet, dass die Bronze die in Europa häufig vorkommenden Art *Psilocybe semilanceata* zeigt (Gartz 1996).

Aufzeichnungen aus der Zeit der Kolonisation Mexikos im 16. Jahrhundert (Sahagún 1583) dokumentieren einen durch die Kirche verbotenen rituellen Gebrauch von *Psilocybe*, wie es ähnlich auch in Europa stattgefunden hat. Die Verbannung heidnischer Rituale durch die Kirche führte eine Zeit lang zum Vergessen um das Wissen psilocybinhaltiger Pilze.

Die erste zuverlässige Datierung in der Neuzeit von 1799 durch den Chemiker Augustus Everad ist eine Vergiftung einer britischen Familie durch *Psilocybe semilanceata*. Diese zeigten nach heutigen Erkenntnissen typische Symptome einer Vergiftung mit Pilzen der Gattung *Psilocybe*. Den ersten Zusammenhang zwischen den bläuenden Pilzen und den Pilzvergiftungen stellte der Mykologe Mordecai Cubitt Cooke auf (Cooke 1902). Er stellte die Hypothese auf, dass die bläuliche Farbe erst durch Umwelteinflüsse hervorgerufen werde und durch die veränderte chemische Umsetzung die Pilze giftig würden.

1.1.1 Die Entdeckung des psychotropen Wirkstoffes der *Psilocybe*-Pilze

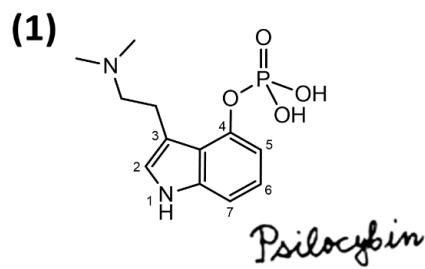


Abbildung 3: Struktur von Psilocybin mit originaler Handschrift des Entdeckers Albert Hofmann (Adelaars 2016)

Die Pilzkulte aus Südamerika wurden erstmals 1940 von dem Botaniker Richard Schultes beschrieben, welcher die bewusstseinsweiternden Pilze der Gattung *Panaeolus* zuordnete (Schultes and Hofmann 1979). Nach einigen Expeditionen gelang es 1955 Robert Wasson als erster westlicher Besucher das Vertrauen des Indianer-Stammes der Mazateken in Mexiko zu erlangen. Er nahm selbst an einer Pilzzeremonie, geführt durch die Schamanin Maria Sabinas, teil und konnte erstmals die Wirkung der zuvor gesammelten Pilze genau beschreiben. Der rituelle Gebrauch dieser Pilze durch die Ureinwohner Mexikos kann auf mehr als 3000 Jahre datiert werden, reicht vermutlich aber noch viel weiter zurück. Die Fruchtkörper aus der Pilzzeremonie konnten später als *Psilocybe caerulescens* beschrieben werden (Hofmann 2005, Carod-Artal 2015). Der Naturstoff **Psilocybin (1)** konnten nachfolgend von Albert Hofmann 1958 identifiziert und ein Jahr später synthetisiert werden (a: (Hofmann, Heim et al. 1958), b: (Hofmann, Heim et al. 1958), c: (Hofmann, Frey et al. 1958))

In den 1960er Jahren wurde der Einsatz des Wirkstoffes Psilocybin in der Psychotherapie intensiv erforscht (Metzner 2005). Ungefähr zur selben Zeit wurde der Gebrauch psilocybinhaltiger Pilze zu Rauschzwecken in der Bevölkerung ebenfalls sehr populär. Als direkte Konsequenz des ansteigenden Konsums wurde der Wirkstoff Psilocybin sowie Psilocin 1971 von der Konvention der Vereinten Nationen als psychotrope Substanz der Klasse eins eingestuft und somit offiziell verboten (Nichols 2004). Als Folge davon wurden ebenfalls alle wissenschaftlichen Studien mit dieser Substanz im Laufe der Zeit eingestellt. Erst ab den 90er Jahren ist erneut eine gestiegene Anzahl von Publikationen zu diesem Themengebiet zu verzeichnen. Heutzutage ist Psilocybin in klinischen Studien und unter der Bevölkerung wieder eines der am meisten genutzten Psychedelika (Krebs and Johansen 2013). Dies liegt vor allem an der relativen Sicherheit des Wirkstoffes. Weiterhin ist die gestiegene Nutzung aufgrund der langen Wirksamkeit der positiven Effekte und der guten oralen Bioverfügbarkeit begründet (Hasler, Grimberg et al. 2004, Johnson, Richards et al. 2008).

1.1.2 Charakteristiken der Pilzgattung *Psilocybe*

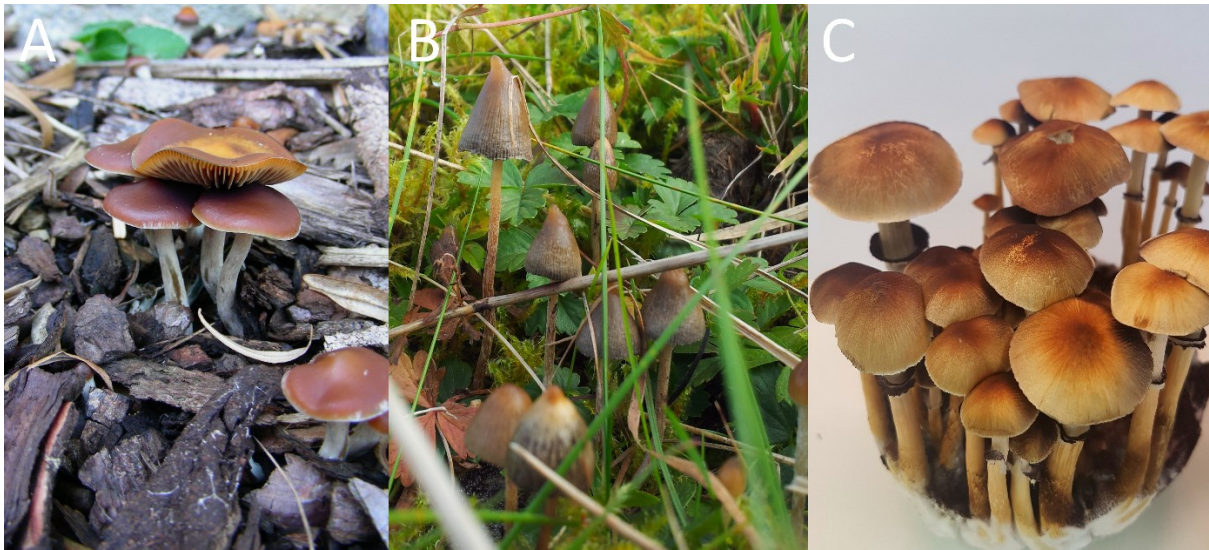


Abbildung 4: Verschiedene *Psilocybe* Arten; A: *P. cyanescens* auf Rindenmulch in Jena (Foto Dirk Hoffmeister), B: *P. semilanceata* auf einer Wiese in Oberjoch, Allgäu; C: im Labor gezüchtete Fruchtkörper von *P. cubensis*

Die Gattung *Psilocybe* gehört zu der Familie der Träuschlingsverwandten (*Strophariaceae*), die in die Unterabteilung *Agaricomycotina* eingeordnet werden. Diese gehören zu der Abteilung der Basidiomyceten. Die Gattung *Psilocybe* umfasst dabei mehr als 150 Arten und sie sind mit Ausnahme der Antarktis ubiquitär. Einige Arten wie *P. semilanceata* (Abbildung 4 B) sind sehr erfolgreich und nahezu weltweit verbreitet. Der Naturstoff Psilocybin wird jedoch nicht nur von allen Vertretern der Gattung *Psilocybe* produziert, sondern konnte auch bei einigen Vertretern der nahe verwandten Gattungen *Panaeolus*, *Inocybe*, *Galerina*, *Pluteus* sowie *Conocybe*, aus der Ordnung *Agaricales*, gezeigt werden (Gartz 1996). Bisher wurden 17 Arten in Europa gefunden (Guzmán, Allen et al. 1998, Guzmán 2009), von denen mindestens sechs endemisch nur in Europa vorkommen, wo auch ihr Ursprung vermutet wird (Guzmán and Castro 2003).

Morphologisch wird der Fruchtkörper der *Psilocybe*-Pilze in einen dünnen Stiel mit charakteristisch glockenförmig bis halbkugelig zugespitzten Hut gegliedert. Die Lamellen sind breit am Stiel angewachsen oder mit Zahn herablaufend und dunkel-, violett- bis schwarzbraun gefärbt. Das Sporenpulver besitzt eine lila bis dunkelbraune Färbung. Der Stiel sitzt zentral, ist kahl bis flockig, und meist unberingt. Pilze der Gattung *Psilocybe* sind Saprobionten, welche bevorzugt in nährstoffreichen Gebieten, koprophil auf Mist und Dungablagerungen wachsen (Krieglsteiner 2000). Die Art *P. cubensis* (Abbildung 4 C) kommt ursprünglich aus Afrika, hat sich mittlerweile aber fast vollständig in den gesamten Tropen

verbreitet, und wächst auf dem Dung von großen Tieren wie Elefanten oder Büffeln und ist ein Kulturfolger auf Rinderfarmen.

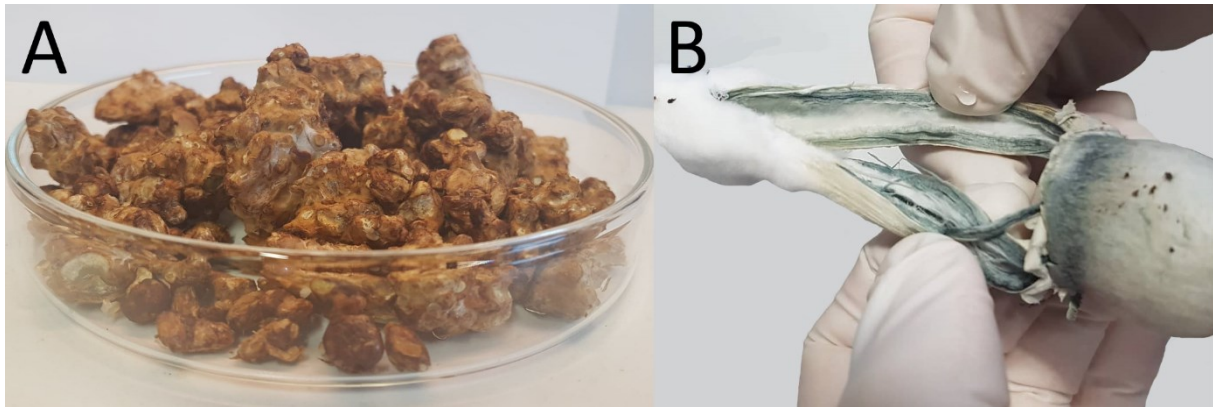


Abbildung 5: Charakteristische Merkmale der Gattung *Psilocybe*; A: Sklerotienbildung durch *P. mexicana* FSU13617, B: Deutlich sichtbare Bläuungsreaktion im leuzistischen Stamm von *P. cubensis* FSU12407

Fast alle Pilze der Gattung *Psilocybe* zeigen eine Bläuungsreaktion nach Verletzung des Myzels oder des Fruchtkörpers, dargestellt an dem leuzistischen *P. cubensis* in Abbildung 5 B. Bei einigen Arten kommt es zur selbstständigen schwarzblauen bis grünlichen Verfärbung des Stiels und des Hutes (Krieglsteiner 2000) und ist ebenso in Abbildung 5 an der Verfärbung des Hutrandes zu erkennen. Die Bläuungsreaktion kann direkt mit dem Vorhandensein von Psilocybin in Verbindung gebracht werden, dessen Auftreten ein Merkmal der Pilzgattung *Psilocybe* darstellt. Die Farbreaktion ist eine oxidative Oligomerisation, welche nach Verletzung durch zwei Enzyme vorbereitet wird. Je nach Substratkonzentration entstehen vielfältige Polymere aus Psilocinmolekülen und das erst sobald der Phosphatester und somit die Schutzgruppe des Psilocybins entfernt wird (Lenz, Wick et al. 2019).

Psilocybin stellt die stabile Vorstufe des neurologisch aktiven Wirkstoffes Psilocin dar, welcher bei Einnahme eine psychedelische Wirkung auslöst. Der Gesamtgehalt von Psilocybin kann in getrockneten Fruchtkörpern bis zu 2 % und mehr betragen (Gartz 1995). Durch die Möglichkeit der chemischen Analyse konnten einige Arten neu eingeordnet werden (adAllen 2011). Erwähnenswert ist auch die beachtliche Sklerotien-Bildung einiger *Psilocybe* Arten. Die in Abbildung 5 A dargestellten Pseudo-Sklerotien wurden durch *P. mexicana* gebildet und stellen ein bei Pilzen auftretendes unterirdisches Überdauerungsstadium dar. In diesem Stadium wird das Myzel stark verdichtet und ist von einer dicken Kortexschicht umgeben, um andauernde Trockenperioden oder Waldfeuer zu überstehen (Dörfelt and Ruske 2014). Interessanterweise wird Psilocybin auch in den Sklerotien bis zu einer Konzentration von

0,65 % gefunden (Gartz 1995) weshalb sie genau wie die Fruchtkörper dieser Pilze weltweit zu Rauschzwecken konsumiert werden.



Abbildung 6: Mikroskopie der Basidiosporen verschiedener *Psilocybe* Arten; A: *P. cyanescens* FSU12414, B: *P. cubensis* FSU12407, C: *P. cubensis* FSU12410, D: *P. mexicana* FSU13617, E: *P. semilanceata* Wildfund

Bei den Ständerpilzen ist eine apikale Verschmelzung zweier haploider Hyphen zu einem dikaryontischen Myzel die Grundvoraussetzung für die spätere Fruchtkörperbildung. Durch die Schnallenbildung werden jeweils die zwei unterschiedlichen Kerne einer Zelle zugeteilt. Mittels Karyogamie verschmelzen beide Kerne und bilden mit der sich anschwellenden Hyphe die sogenannte Basidie, welche mit einigen Abweichungen meist vier jeweils meiotisch gebildeten Sporen enthält. Die Basidiosporen der verschiedenen *Psilocybe* Arten haben alle eine ellipsoide-mandelförmige Form gemeinsam (Abbildung 6). Die Sporenwand der verschiedenen Arten weist eine unterschiedliche Stärke auf, welche von dünn bis dickwandig reichen kann. Der Keimporus ist fast ausschließlich abgestutzt und nur selten unscheinbar zu erkennen (Krieglsteiner 2000). Für die Bestimmung der Gattung *Psilocybe* ist vor allem die dunkelbraune bis schwarze Farbe der abgeworfenen Sporen ein wichtiges Erkennungsmerkmal.

1.2 Pharmakologie und Chemie des Psilocybins

1.2.1 Physiologische und neuropsychologische Effekte von Psilocybin

Psilocybin wird nach erfolgter oraler Einnahme mittels alkalischer Phosphatase in der Magenschleimhaut zu Psilocin dephosphoryliert. Somit stellt Psilocybin das stabile Prodrug und Psilocin den eigentlichen Wirkstoff dar. Psilocin wird durch den Blutkreislauf in alle Gewebe und das Gehirn verteilt und die Enzyme UGT1A9/UGT1A10 (Geiger, Wurst et al. 2018) glucuronidieren das Psilocin zu Psilocin-O-Glucuronid (Grieshaber, Moore et al. 2001, Manevski, Kurkela et al. 2010). In dieser Form wird ein Großteil des Psilocins bereits nach 24 Stunden wieder vom Körper über den Urin ausgeschieden (Hofmann 1968).

Die höchsten Konzentrationen von Psilocin wurden bei Ratten und Mäusen in den Hirnregionen des Neokortexes, Hippocampus und dem extrapyramidalmotorischen System gemessen (Hopf and Eckert 1974). Psilocin besitzt dabei eine besondere Bindungsaffinität zu den Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} mit K_i Werten von 107,2 nM sowie mit einer K_i von 219,6 nM zu den 5-HT_{1B} Rezeptoren. Ebenfalls konnte eine Bindungsaffinität von Psilocin mit einer K_i von 3,5 nM an den 5-HT₇ Rezeptoren sowie mit 2645 nM an den Dopaminrezeptoren D₃ gezeigt werden (Ray 2010, Halberstadt, Koedood et al. 2011).

Die beobachtete Aktivität an den 5-HT_{2A} Rezeptoren ist für die psychedelische Wirkung verantwortlich, während der Einfluss der Aktivität an den Dopamin-Rezeptoren und einer Vielzahl weiterer Rezeptoren (Ray 2010) noch wenig verstanden ist. Interessant ist die niedrige K_i der 5-HT₇ Rezeptoren, welche sich als vielversprechendes Target für die Behandlung von Depressionen gezeigt haben (Naumenko, Popova et al. 2014). Psychedelische Effekte treten oral konsumiert bereits ab der geringen Menge von 15 mg bei einem Körpergewicht von 75 kg auf (Hasler, Grimberg et al. 2004), und sind bereits nach 30 bis 75 Minuten wahrnehmbar und können bis zu 4-6 Stunden anhalten (Hasler, Grimberg et al. 2004). Einige der somatischen Wirkungen beruhen auf einer gesteigerten Aktivität des Sympathikus, bemerkbar durch eine Weitung der Pupillen und einem erhöhten Blutdruck und Puls (Griffiths, Richards et al. 2006). Messbar ist eine Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdrucks um 10-30 mmHg. Unter dem Einfluss von Psilocin konnten keine Abweichungen der elektrischen Aktivitäten des Herzens im EKG nachgewiesen werden (Hasler, Grimberg et al. 2004). Andere mögliche körperliche Nebenwirkungen sind ein Schwindel- und Schwächegefühl, vor allem aber eine kurze Übelkeit mit möglichem Erbrechen direkt nach Einnahme der Pilze (Peden and Pringle 1982). Es konnte außerdem ein Einfluss auf die Produktion diverser Hormone nachgewiesen werden. Nach einer Einnahme von Psilocybin kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Prolaktin, Corticotropin, Cortisol und Thyreotropin. Jedoch konnte bereits fünf Stunden nach der Einnahme ein kompletter Rückgang der gesteigerten Produktion aller Hormone beobachtet werden (Gouzoulis-Mayfrank, Schreckenberger et al. 1999, Hasler, Grimberg et al. 2004).

Psychotrope und neuropsychologische Effekte von Psilocybin

Sehr geringe Dosen von Psilocybin verursachen Schläfrigkeit und steigern die Wahrnehmung von Gefühlen, was zu einer Verstärkung der vorherrschenden Laune sorgt (Hasler, Grimberg et al. 2004). Mittlere Dosen von Psilocybin führen bereits zu einer veränderten Wahrnehmung der Umgebung und des Bewusstseins, werden nicht als real eingeschätzt und sind daher gut zu kontrollieren.

Hohe Dosen von Psilocybin hingegen bewirken intensive psychedelische Erfahrungen, welche zu starken Wahrnehmungsveränderungen führen. Es können traumähnliche Zustände erfahren werden, oft begleitet von Halluzinationen und Synästhesien. Körperlich sind Parästhesien in Formen von Missempfindungen wie einem Kribbeln der Haut zu beobachten. Die Wirkung reicht von einer veränderten Selbsteinschätzung bis hin zu einer kompletten Derealisation mit der Umwelt. Häufig kommt es zu einem gleichzeitigen Erlebnis einer Depersonalisierung, bei der sich die körperlichen Empfindungen bis zum kompletten Verlust der Persönlichkeit verändern. Dabei können Zustände des veränderten Körpererlebens empfunden und der Körper oder Teile dessen als andersartig wahrgenommen werden. Zusätzlich verändert sich das visuelle Empfinden und es kann zu einem Verlust der Zeitwahrnehmung kommen. Nicht unüblich dabei sind auch positive spirituelle und mystische Erfahrungen der Konsumenten. Die bereits empfundene Gefühlslage verstärkt sich durch die Einnahme von Psilocybin und kann zu Zuständen von absoluter Euphorie bis hin zu Angstgefühlen führen (Hollister 1961, Hasler, Grimberg et al. 2004, Geyer and Vollenweider 2008). Die durch Psilocybin ausgelösten Symptome können durch Ketanserin (5-HT_{2A/C} Antagonist) oder Risperidon (5-HT_{2A/C} und D₂ Antagonist) sofort aufgehoben werden.

Interessanterweise konnten positive Langzeitwirkungen nach Einmalgabe bis zu 25 Jahren nach dem Konsum nachgewiesen werden (Doblin 1991). Dieses Resultat konnte in einer neuen doppelblinden und kontrollierten Studie bestätigt werden (Griffiths, Richards et al. 2006). Patienten berichteten aufgrund dieser tiefgreifenden Erfahrungen von einer positiven Änderung ihrer Grundeinstellungen sowie ihres Verhaltens. Eine weitere Studie kam zu einem ähnlichen Ergebnis der aufbauenden Langzeitwirkungen durch die Einnahme von Psilocybin. Auffallend war eine bleibende gesteigerte Offenheit der Personen, welche mystische Erfahrungen während der Einnahme machten (MacLean, Johnson et al. 2011). Weitere Studien zeigten sehr vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit Depressionen im

Krebsendstadium, behandlungsresistenten Depressionen oder Suchtverhalten (Johnson and Griffiths 2017). Phase 2 Studien zu finden unter der Studiennummer NCT00957359, durchgeführt durch die Johns-Hopkins-Universität und die New-York-Universität, zeigten Behandlungserfolge von 60 - 80 % bei Depressionen und Angstzuständen durch eine Einmalgabe (Sherwood and Prisinzano 2018). Studien der klinischen Phase 3 mit dem Ziel der Zulassung des Prodrugs Psilocybin sind momentan bereits durch die Institute Heffter und Usona Research in der Planung (Sherwood and Prisinzano 2018).

Aus einer Vielzahl von toxikologischen und klinischen Studien geht hervor, dass Psilocybin eine sehr geringe Toxizität besitzt (Passie, Seifert et al. 2002, Nichols 2004). Es verursachte keine Schäden an den Organen von Ratten und Schweinen (Cerletti 1958) und besitzt keine neurotoxischen Eigenschaften (Johnson, Richards et al. 2008). Die mittlere letale Dosis (LD_{50}) für Ratten und Mäuse liegt bei 280 – 285 mg/kg. Wenn man von durchschnittlich 0.1 % Wirkstoffgehalt in frischen Pilzen ausgeht, wäre bei einem 75 kg schweren Menschen eine unkonsumierbare große Portion von mehr als 21 kg frischer oder 2,1 kg getrockneter Pilze notwendig um überhaupt die mittlere letale Dosis zu erreichen (Usdin and Efron 1972). In diesem langen Zeitraum, in welchem Psilocybin in der Form von psychedelischen Pilzen konsumiert wird, kam es bisher zu keinen dokumentierten körperlichen Schäden durch den Wirkstoff Psilocybin (Hofmann 2005).

1.2.2 Chemie des Psilocybins

Psilocybin ist ein sehr einfach aufgebauter Naturstoff, welcher aus dem heterozyklischen und aromatischen Grundgerüst eines *N,N*-Dimethyltryptamins aufgebaut ist. Dennoch besitzt Psilocybin mit der Phosphoryloxygruppe an der vierten Position des Indolringes eine Besonderheit, da die 4-Hydroxylierung des Indols sowie der Phosphorsäureester selten bei Naturstoffen zu beobachten sind. Psilocybin hat eine molekulare Masse von m/z 284.1 ($C_{12}H_{17}N_2O_4P$) und besitzt eine psychotrope Wirkung auf den Menschen. Durch diese Charakteristiken gehört Psilocybin in die Klasse der Indolalkaloide.

Psilocybin liegt als Zwitterion vor und besitzt ein tertiäres Amin, aufgrund dieser Eigenschaften ist es sehr gut wasserlöslich. Aufgrund des Indolfragmentes kann Psilocybin in der Dünnschichtchromatografie mittels Ehrlich-Reagenz nachgewiesen werden und zeigt eine typische Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Nach Aufnahme wird im Körper die

Phosphatgruppe des Psilocybins abgespalten und es entsteht das psychotrope Psilocin, welches eigentlich für die psychedelischen Wirkungen verantwortlich ist.

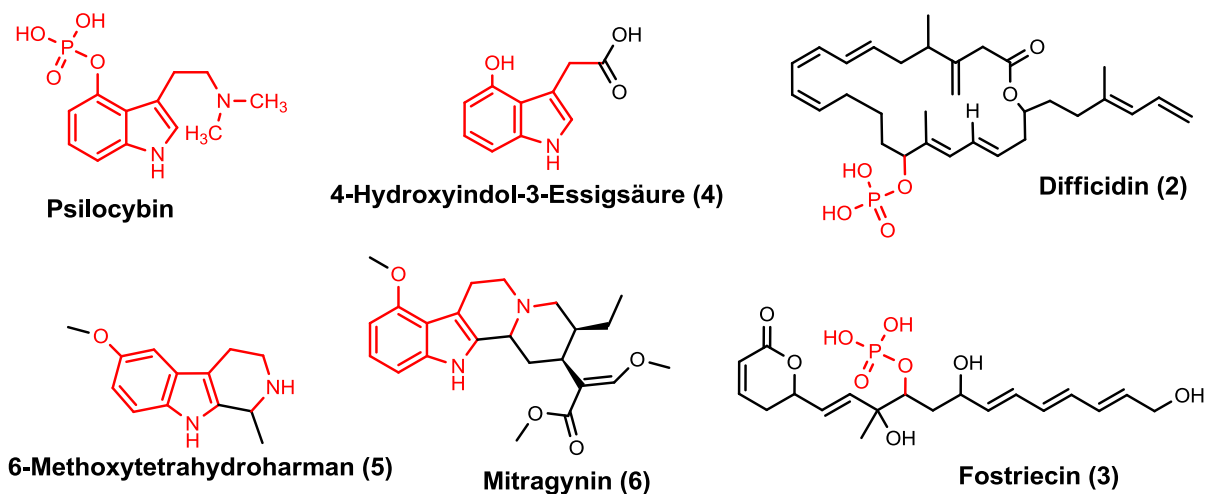


Abbildung 7: Struktur des Psilocybins verglichen mit Naturstoffen, welche mindestens eine Charakteristik teilen

Hervorzuheben ist der ungewöhnliche Phosphorsäureester an der hydroxylierten vierten Position des Indols. Weitere Sekundärmetaboliten mit ähnlicher Phosphorylierung konnte bisher nur aus Bakterien und einem pflanzlichen Vertreter isoliert werden. Bekannte Beispiele sind **Difficidin (2)** aus *Bacillus subtilis* (Zimmerman, Schwartz et al. 1987), **Fostriecin (3)**, Leustroducsins und das Phoslactomycine aus *Streptomyces* spp. (Palaniappan, Kim et al. 2003) und das erst kürzlich entdeckte Tagetitoxin aus *Pseudomonas syringae* (Aliev, Karu et al. 2016).

Auch die Hydroxylierung der Position 4 des Indolgerüsts ist bisher sehr selten bei Pilzen beobachtet worden, es sind bisher nur die 4-Hydroxylierung von **4-Hydroxyindol-3-yllessigsäure (4)** aus *Aspergillus niger* (Koshcheenko, Baklashova et al. 1977) und *Cortinarius brunneus* (Teichert 2008) aus dem Reich der Pilze bekannt. Beispiele für methoxylierte Indole aus dem Pflanzenreich sind am C6 **methoxylierte β -Carboline (5)** aus *Banisteriopsis argentea* (Ghosal and Mazumder 1971) und das am C4 methoxylierte **Mitragynin (6)** aus *Mitragyna speciosa* (Shellard 1974). Diese Verbindungen sind alle aus einem Tryptamingrundgerüst aufgebaut und besitzen einen zusätzlichen Sauerstoff am Indolring.

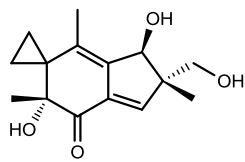
1.3 Die Produktion von Sekundärmetaboliten in Pilzen



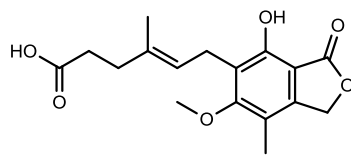
Abbildung 8: Fruchtkörperbildung durch *P. cubensis* FSU12407 und FSU12410 Stämme, welche in den Laboratorien für genaue Analysen enthaltener Indolalkaloide wie dem Psilocybin kultiviert wurden

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen und Herstellung lassen sich die sekundären Metaboliten in verschiedene Klassen einteilen. Einige wichtige Klassen sind die Terpene, Polyketide sowie die nach der Herstellungsart kategorisierten ribosomalen oder nichtribosomalen Proteine. Alle Naturstoffe werden jedoch aus wenigen Vorstufen aufgebaut, welche immer aus dem Primärmetabolismus stammen. Ein für Pilze gängiger Weg sind aus Aminosäuren abgeleitete Naturstoffe, welche keine Peptidstruktur aufzeigen, sondern monomer bleiben. Ein prominentes Beispiel für Basidiomyceten ist die Ibotensäure, welche in verschiedenen Vertretern der *Amanita*-Gattung, wie z.B. Fliegenpilz oder Pantherpilz, gefunden wird (Bowden, Drysdale et al. 1965), sowie Psilocybin in den Fruchtkörpern der *Psilocybe* Pilze (Abbildung 8).

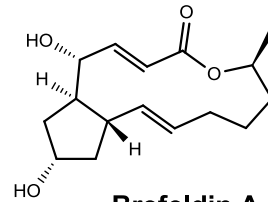
Zu den ersten beschriebenen Naturstoffen aus den Basidiomyceten gehörten chinoide Farbpigmente wie **Atromentin (7)** und die Polyporsäure. Die Isolation aus den Fruchtkörpern gelang bereits 1877 Stahlschmidt und Thörner (Stahlschmidt 1877, Thörner 1878). Es produzieren nicht nur exklusiv die Basidiomyceten eine Fülle an Naturstoffen, sondern auch Ascomyceten weisen eine große Bandbreite von Sekundärmetaboliten auf. Als Beispiel dient hier ein Antibiotikum aus dem Sekundärmetabolismus eines *Penicillium* Pilzes, welches 1893 isoliert und kristallisiert wurde: Es handelte sich um **Mycophenolsäure (8)**, welche das Wachstum von Milzbranderreger verhindern konnte.



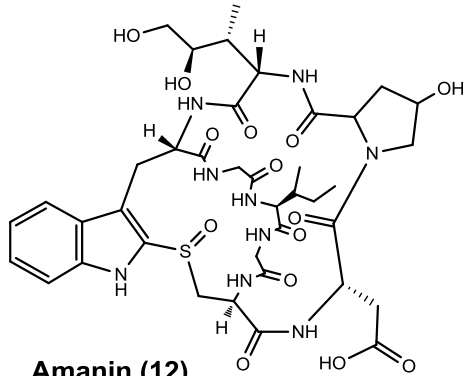
Illudin S (14)



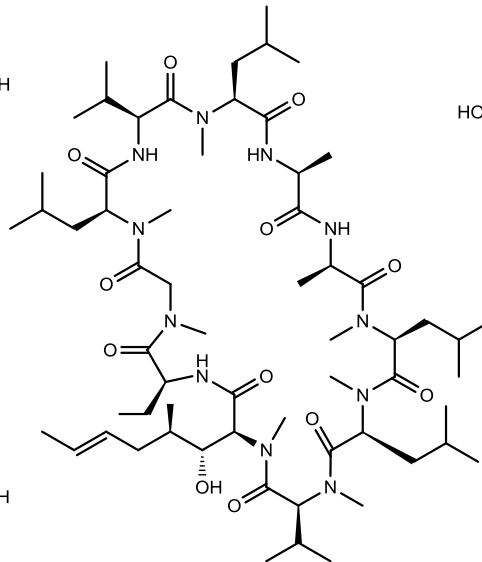
Mycophenolsäure (8)



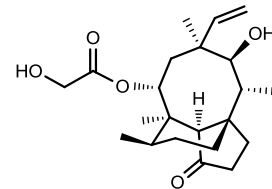
Brefeldin A (10)



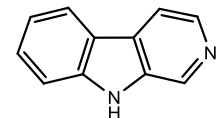
Amanin (12)



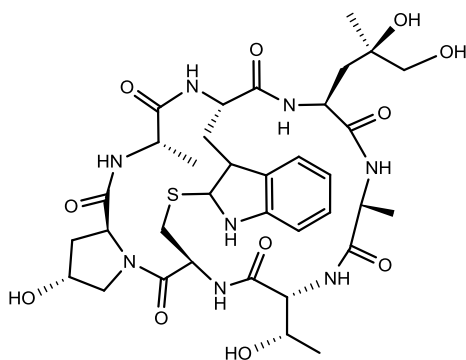
Cyclosporin A (9)



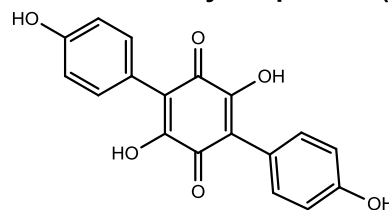
Pleuromutilin (13)



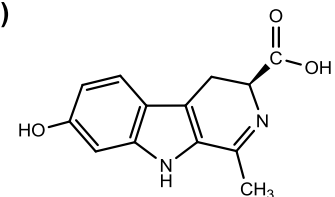
Norharman (15)



Phalloidin (11)



Atromentin (7)



Brunnein A (16)

Abbildung 9: Naturstoffe aus Pilzen

Nach der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahre 1928 folgte in den 1940er Jahren eine intensive Suche in den filamentösen Pilzen. Die Wissenschaftler Stoll, Tamm und Stähelin konnten eine Reihe bemerkenswerter Stoffe isolieren, unter anderem **Cyclosporin A (9)** aus *Tolypocladium inflatum*, **Brefeldin (10)** aus *Phoma brefeldianum* und Verrucarin aus *Myrothecium verrucaria*. Weitere wichtige, aus Basidiomyceten isolierte, Naturstoffe sind die 1937 entdeckten Phallotoxine und 1941 die Amatoxine, in der Abbildung gezeigt an den Vertretern **Phalloidin (11)** und **Amanin (12)**. Die Amatoxine stellen die Ursache für die tödlichen Pilzvergiftungen mit Fruchtkörpern aus der Gattung *Amanita* dar (Faulstich 1979). Einer der ersten antibakteriellen Wirkstoffe aus einem Basidiomyceten war das 1951 entdeckte **Pleuromutilin (13)** aus *Pleurotus mutilus*, welches ein antibakteriell wirkendes Diterpen darstellt (Kavanagh, Hervey et al. 1951). Die Pleuromutiline dienen im Nachgang als Vorlage für das semisynthetische Antibiotikum Retapamulin. Ein weiteres Beispiel aus dem

Jahr 1970 sind die Cyathane aus *Cyathus helenae*, welche ebenso Diterpene darstellen und vielfältige antibiotische, antimikrobielle und krebshemmende Wirkungen aufweisen (Ayer and Taube 1972). Omphalotin A, ein Dodecapeptid aus dem Pilz *Omphalotus olearius*, wurde 1997 erstmals isoliert und stellte sich als erfolgreiches Toxin gegen Nematoden heraus (Mayer, Kilian et al. 1999). Weiterhin konnten Sesquiterpene mit starken krebshemmenden Eigenschaften namens **Illudine (14)** schon früh aus den Basidiomyceten der Gattung *Omphalotus* isoliert und strukturaufgeklärt werden (McMorris and Anchel 1965). In den folgenden Jahren konnte die Biosynthese von Illudin M aus radioaktiv markierter Mavolonsäure charakterisiert werden (Hanson and Marten 1973). Die Isolation von Psilocybin, als sekundäres Stoffwechselprodukt der Pilzgattung *Psilocybe*, gelang 1958 dem Schweizer Chemiker Albert Hofmann (a:(Hofmann, Heim et al. 1958), b: (Hofmann, Frey et al. 1958)). Die bewusstseinserweiternde Wirkung dieses Pilzes konnte auf die Substanz Psilocybin zurückgeführt werden.

Eine für diese Forschungsarbeit interessante Entdeckung war die Isolation von β -Carbolinen wie **Norharman (15)** oder der **Brunneine A (16)** aus dem Basidiomyceten *Hygrophorus eburneus* (Teichert, Lübken et al. 2008). Dies war lediglich ein Bruchteil der interessanten Moleküle, welche bereits aus Basidiomyceten isoliert werden konnten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Basidiomyceten wahrhaftige Meisterchemiker sind, welche ein großes Repertoire an einfachen und komplexen Stoffwechselprodukten synthetisieren können. Auch nach über 140 Jahren intensiver Forschungsarbeit kann in den Metabolomen dieser Pilze noch eine große Fülle an Naturstoffen entdeckt werden.

1.3.1 L-Tryptophan als Substrat für den Sekundärstoffwechsel

Durch Fütterungsexperimente mit radioaktiven ^3H - oder ^{14}C - isotopenmarkierten Substraten konnte bereits 1961 gezeigt werden, dass Psilocybin aus der Aminosäure L-Tryptophan aufgebaut wird (Brack, Hofmann et al. 1961). Die zugrundeliegenden Stoffwechselwege zur Bildung des L-Tryptophans konnten in der Vergangenheit bereits intensiv mithilfe von Bakterien erforscht werden, und die Grundlagen der Bildung des Tryptophans durch Bakterien werden nachfolgend vorgestellt: Der erste Schritt in der Synthese der aromatischen Aminosäure L-Tryptophan beginnt mit Chorismat als Vorläufermolekül. Chorismat wird mittels Shikimisäureweg aus einfachen Stoffwechselprodukten der Glykolyse wie

Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat hergestellt. Dafür sind 10 verschiedene Enzyme notwendig, welche alle von einem einzigen Operon des Bakteriums codiert werden (*aroABCDEFGHKL*). Im nachfolgenden Schritt zweigt sich die Biosynthese des L-Tryptophans von den anderen aromatischen Aminosäuren ab und es beteiligen sich insgesamt vier Enzyme, welche durch das *trpABCDE*-Operon codiert werden. Aufgrund des großen Aufwandes mit dem L-Tryptophan hergestellt wird, erfolgt eine effiziente Reprimierung der Gene. Dies erfolgt beim *trp*-Operon über zwei unterschiedliche Mechanismen, dem Trp-Repressor, der bei mittleren bis hohen L-Tryptophan-Konzentrationen in der Zelle aktiv ist und die Bildung einer RNA-Schleife bei niedrigen L-Tryptophan Konzentrationen. Durch die Bildung einer Haarnadelstruktur wird der Transkriptionskomplex in der wachsenden *trp*-mRNA destabilisiert, dieser Vorgang wird als Attenuation bezeichnet (Slonczewski and Foster 2012).

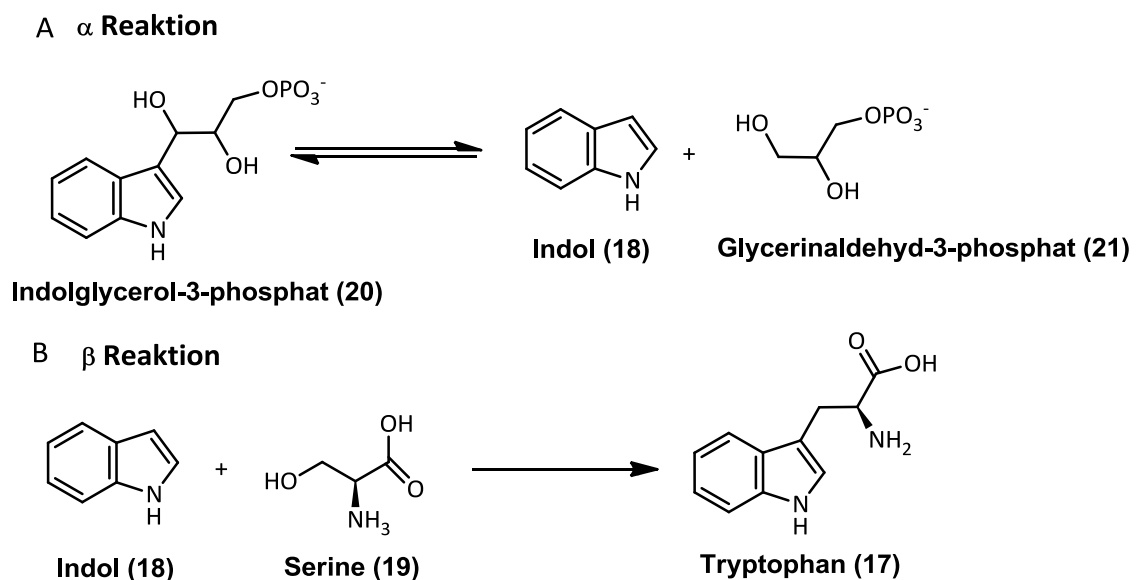


Abbildung 10: Umsatz von Indol und Serin zu Tryptophan mittels Tryptophan Synthase (TS) aufgeteilt in; A: α - und B: β -Reaktion

Der letzte Schritt der Biosynthese zu **L-Tryptophan (17)** wird durch die Tryptophan-Synthase (TS) katalysiert, welche durch das *trpB*-Gen codiert wird. Die TS ist ein $\alpha_2\beta_2$ bi-funktionales und von Pyridoxalphosphat (PLP) abhängiges Enzym, das in Pilzen als Homodimer vorliegt (Wolf and Hoffmann 1974). Die TS katalysiert die letzten beiden Halbschritte bei der Synthese von **Indol (18)** und **Serin (19)** zu L-Tryptophan und kommt in Bakterien, Pflanzen und Pilzen vor, fehlt jedoch im Menschen. Es war das erste Enzym, bei welchem zwei verschiedene katalytische Zentren entdeckt wurden und welches mittels eines Substratkanals die Produkte von einem katalytischen Zentrum in das nächste transportiert (Anderson, Miles et al. 1991).

Mittlerweile weiß man, dass die α -Reaktion die reversible Retro-Aldol Spaltung von **Indolglycerol-3-phosphat (20)** zu Indol und **Glycerinaldehyd-3-phosphat (21)** ist. Es handelt sich um eine Säure-Base-Katalyse, durchgeführt an der α -Untereinheit des Enzyms. Die Spaltung der Kohlenstoffbindung von Indolglycerol-3-phosphat wird durch die Tautomerisierung des Indolringes aktiviert. Anschließend folgt die β -Reaktion, welche von der β -Untereinheit unter Anwesenheit von Pyridoxalphosphat katalysiert wird. Die β -Reaktion umfasst die Kondensation von Indol und L-Serin zu L-Tryptophan und Wasser mittels einer Reihe von Eliminierungen und Additionsreaktionen. Die Aufklärung der Kristallstruktur dieses komplexen Enzyms wurde in der Vergangenheit an Bakterien erforscht (Raboni, Bettati et al. 2009). Die TS ist in der Lage, ein breites Spektrum von Substraten umzusetzen. Es ist sogar möglich halogenierte oder anderweitig substituierte Indole zu dem jeweiligen substituierten L-Tryptophan umzusetzen (Goss and Newill 2006). Durch diese Eigenschaft erweitert sich das Anwendungsspektrum der TS enorm und bietet vielfältige Möglichkeiten in der Biotechnologie. Durch die Verwendung einer gentechnisch veränderten TS aus *Salmonella* konnten erstmals biotechnologisch β -Methyl-Tryptophane hergestellt werden, welche als wichtige Bausteine für die Herstellung von Peptidmimetika dienen (Francis, Winn et al. 2017). Die Eigenschaft der flexiblen Substratakzeptanz für die Herstellung substituierten L-Tryptophans wird auch im Zuge dieser Forschungsarbeit eine grundlegende Rolle spielen.

1.3.2 Postulierte Biosynthese des Psilocybins

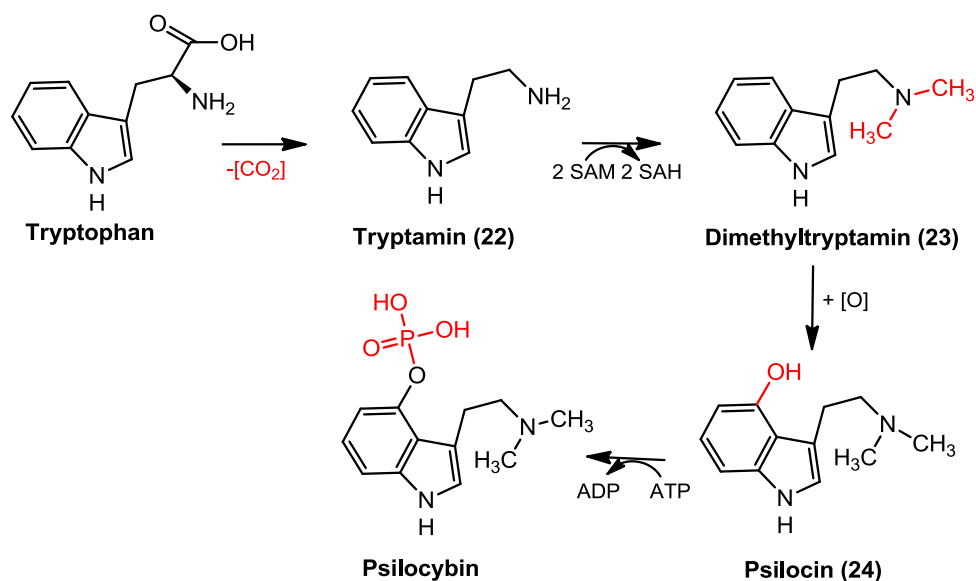


Abbildung 11: Bisher aktueller Biosyntheseweg des Psilocybins nach Agurell und Nilsson in vier Schritten ausgehend von L-Tryptophan

Nach Veröffentlichung des Wirkstoffes Psilocybin von Wasson (Wasson 1957) kam es in den darauffolgenden Jahren zu einer intensiven Forschungsarbeit an diesem vielversprechenden Molekül. Die erstmalige Isolation von Psilocybin aus Kulturen von *P. cubensis* gelang Catalfomo und Tyler (Catalfomo and Tyler 1964). Durch Agurell und Nilsson wurde 1968 mit einer zur damaligen Zeit qualitativ hochwertigen Arbeit die Grundlage der vermuteten Biosynthese geschaffen, deren getroffenen Annahmen bis zu unseren Veröffentlichungen der aktuelle Stand der Wissenschaft waren. Mittels Fütterung von ^{14}C und ^3H markierten Tryptaminen im Pilz *P. cubensis* und dessen Einbau in das Psilocybin konnten erste Rückschlüsse auf die vermutete fünf-schrittige Biosynthese gezogen werden (Abbildung 11). Die Arbeitsgruppe um Agurell und Nilsson kam zu dem Ergebnis, dass L-Tryptophan zu **Tryptamin (22)** decarboxyliert werden muss, um anschließend direkt zu **N,N-Dimethyltryptamin (23)** methyliert zu werden. Nachfolgend vermuteten die Wissenschaftler die Hydroxylierung zu **Psilocin (24)** und anschließend die Phosphorylierung zu Psilocybin unter ATP-Verbrauch. Abschließend legten sie aber auch schon damals die Möglichkeit offen, dass noch andere Biosynthesewege möglich sind. In den folgenden Jahren wurden weitere Produkte wie Norbaeocystin und Baecocystin in Pilzen der Gattung *Psilocybe* und später auch in *Panaeolus* und *Conocybe* gefunden (Leung and Paul 1968, Repke, Leslie et al. 1977). Weitere Arbeiten konnten Psilocybin und dessen Zwischenprodukte auch in Pilzen der Gattung *Inocybe*, *Pluteus* und *Gymnopilus* nachweisen (Stijve, Klan et al. 1985, Gartz 1987, Gartz 1989). Des Weiteren konnte Aeruginascin, das quartäre Salz von Psilocybin, entdeckt (Gartz 1989) und später strukturell aufgeklärt werden (Jensen, Gartz et al. 2006).

Obwohl die Struktur des Psilocybins nunmehr schon seit fast 60 Jahren bekannt ist, ist die enzymatische Grundlage zur Biosynthese weiterhin ungeklärt.

1.4 β -Carbolin-Alkaloide

Die β -Carboline sind eine große Gruppe von natürlichen oder synthetischen Indolalkaloiden, welche eine trizyklische Pyrido-[3,4-b]-Indolring Struktur aufweisen. Die β -Carboline können anhand ihrer Sättigung des Ringes in unterschiedliche Klassen aufgeteilt werden. Ungesättigte Vertreter werden als aromatische β -Carboline (βCs) sowie gesättigte Vertreter als Dihydro- β -Carboline (DH βCs) und Tetrahydro- β -Carboline (TH βCs) bezeichnet. β -Carboline sind oft mehrfach am Indol- oder Pyridinring substituiert. Die einfachste chemische Synthese der β -Carboline ist die sogenannte *Pictet-Spengler* Kondensation. Dabei können

Indolyethylamine oder Tryptophan-Derivate mit Aldehyden oder α -Ketonsäuren reagieren, wobei diese Reaktion unter den richtigen Bedingungen auch spontan abläuft (Cao, Peng et al. 2007).

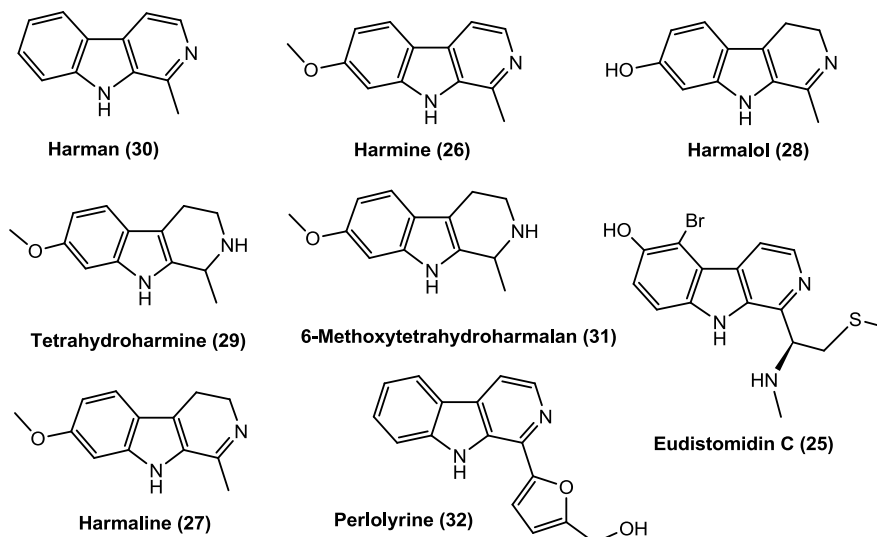


Abbildung 12: Unterschiedliche biogene β -Carboline

β -Carboline, welche in der Vergangenheit schon früh von Naturstoffchemikern entdeckt wurden, konnten in der Vergangenheit aus Pflanzen wie der Steppenraute *Peganum harmala* sowie *Banisteriopsis caapi* (Perkin and Robinson 1919, Callaway, Brito et al. 2005), den Algen *Undaria pinnatifida* (Tascon, Gagliardi et al. 2017) oder auch in Pilzen der Art *Hygrophorus eburneus* (Teichert, Lübken et al. 2008) nachgewiesen werden. In den letzten 20 Jahren wurden eine Vielzahl weiterer β -Carboline aus den unterschiedlichen Pflanzen, sogar aus Wirbellosen im Meer (Aiello, Fattorusso et al. 1987) oder am Land (Stachel, Stockwell et al. 1999) gefunden. Ein Beispiel sind **Eudistomine (25)**, welche krebshemmende (Lake, Blunt et al. 1989, Kobayashi, Cheng et al. 1990), antivirale (Rinehart, Kobayashi et al. 1984) sowie antimikrobielle Eigenschaften gezeigt haben (Kobayashi, Harbour et al. 1984). Erwähnenswert ist auch das Nostocarbolin aus dem Cyanobakterium *Nostoc* 78-12A, welches sich als Cholinesterase Inhibitor herausgestellt hat (Becher, Beuchat et al. 2005), sowie das neuroprotektive 9-Methyl- β -carboline (Polanski, Rommelspacher et al.)

Die Steppenraute *Peganum harmala* (Herraiz, González et al. 2010) mit den β -Carbolinen **Harmin (26)**, **Harmalin (27)** und **Harmalol (28)**, sowie vielen weiteren in Spuren enthaltenen β -Carbolinen, wird als traditionelle Pflanzendroge in der Region des Mittleren Osten und Nordafrika oder China teilweise schon seit hunderten Jahren für die unterschiedlichsten

medizinischen Anwendungen eingesetzt (Moloudizargari, Mikaili et al. 2013). Die im Amazonasbecken vorkommende Liane *Banisteriopsis caapi* mit den Alkaloiden Harmin, Harmalin und **Tetrahydroharmin (29)** wird zusammen mit der dimethyltryptaminhaltigen Pflanze *Psychotria viridis* zu einem Gebräu namens Ayahuasca vermischt (Labate and Jungaberle 2011). Das Getränk wirkt stark psychotrop und wird durch die indigenen Völker Südamerika seit mindestens 1000 Jahren bis in die aktuelle Zeit in schamanistischen Zeremonien eingesetzt (Miller, Albarracin-Jordan et al. 2019). Norharman und **Harman (30)** zeigten sogar eine Interkalierung in die DNA, und könnten daher sogar potenziell krebserregend sein (Oda, Nakamura et al. 1988). Weitere Derivate wie das **6-Methoxytetrahydroharmalin (31)** hingegen erwiesen sich schon bei einer geringen Dosis von 1,5 mg/kg Körpergewicht als stark psychoaktiv (Naranjo 1967), wohingegen **Perlolyrin (32)** und dessen Derivate antithrombotische Eigenschaften aufzeigten (Tang, Jiang et al. 2001).

Tatsächlich fanden sich schon in den Aufzeichnungen von Bernardino de Sahagún aus dem 16. Jahrhundert Nachweise des Gebrauchs von Kakao zusammen mit Psilocybin Pilzen in einer Zeremonie namens *Monanacahuia*. Heute wissen wir, dass in Kakao einige Stoffe enthalten sind, welche effektiv die Arbeit der Monoaminoxidase inhibieren und so die Wirkung von Psilocin steigern könnten (Feldman 1998). Auf diversen Internetportalen kursieren auch Erfahrungsberichte zum Mischkonsum aus Psilocybin-haltigen Verbindungen zusammen mit MAO-Hemmern. Solche Kombinationen werden in Anlehnung an Ayahuasca, Psilohuasca genannt.

2. Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt auf der tiefgreifenden Untersuchung unterschiedlicher Indolalkaloide aus den Pilzen der Gattung *Psilocybe*:

Identifizierungen der Enzyme der Psilocybin Biosynthese

Mittels mehrfacher Genomsequenzierungen und anschließender bioinformatischer Suche sollen die passenden Gene aufgespürt und die dadurch kodierten Enzyme biochemisch charakterisiert werden.

Biokatalytische Produktion von Psilocybin

Aufgrund des gestiegenen pharmazeutischen und medizinischen Interesses soll eine biokatalytische Route für die *in vitro*-Produktion von Psilocybin und Derivaten entwickelt werden.

Untersuchungen zur Methyltransferase TrpM aus *Psilocybe cubensis*

Gesucht wurden die Gene für eine weitere SAM-abhängige Methyltransferase. Im Zuge dieser Arbeit soll mittels heterolog hergestelltem Enzym die Funktion dieser zweiten MT charakterisiert werden.

Analyse des Naturstoffprofils der Extrakte von *Psilocybe* sp.

Mittels weiterführenden chemisch-analytischen Untersuchungen des Sekundärstoffprofils soll in den Extrakten aus *Psilocybe* spp. nach der Produktion von weiteren Naturstoffen gesucht werden.

3. Publikationen

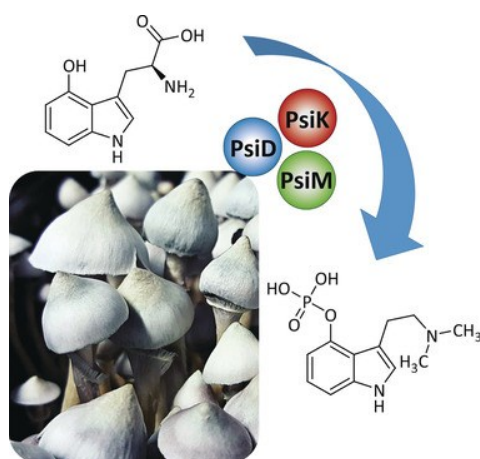
3.1 Enzymatic synthesis of psilocybin

Janis Fricke*, **Felix Blei***, Dirk Hoffmeister

Angewandte Chemie Internationale Edition, Band 56, Ausgabe 40, Seiten 12352-12355, 2017

Angewandte Chemie, Band 129, Ausgabe 40, Seiten 12524-12527, 2017

Zusammenfassung



In der Arbeit wurde durch eine schrittweise Synthese der Ablauf der Biosynthese des Psilocybins durch die vier Biosynthese-Enzyme gezeigt. Ausgehend von dem Substrat L-Tryptophan wird durch die Monooxygenase PsiH, der Decarboxylase PsiD, der Kinase PsiK und der sehr spezifischen Methyltransferase PsiM die Biosynthese von Psilocybin katalysiert. In einem kombinierten Enzymansatz konnten ausgehend von

4-Hydroxytryptophan mittels der drei Biosynthese-Enzyme PsiD, PsiK und PsiM Psilocybin hergestellt werden. Interessanterweise erfolgt die Produktion von Psilocybin auf einem neuen, bisher nicht postulierten Biosynthese-Weg. Die Charakterisierung der Psilocybin-Biosynthese stellt die Grundlage für eine spätere biotechnologische Anwendung dar.

Angaben zum Eigenanteil: 40 %

Herstellung Plasmide für Heterologe Genexpression, Produktion von PsiM in *E. coli*, Aufreinigung und Analyse von *in vitro*-Assays mittels HPLC, enzymatische Herstellung und Aufreinigung des Substrates 4-Hydroxytryptophan, Aufreinigung Endprodukt für NMR Spektroskopie, Mitarbeit beim Manuskript

***= Beide Autoren haben im gleichen Umfang zur Arbeit beigetragen.**

Jena, den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

Biosynthesis

International Edition: DOI: 10.1002/anie.201705489
German Edition: DOI: 10.1002/ange.201705489

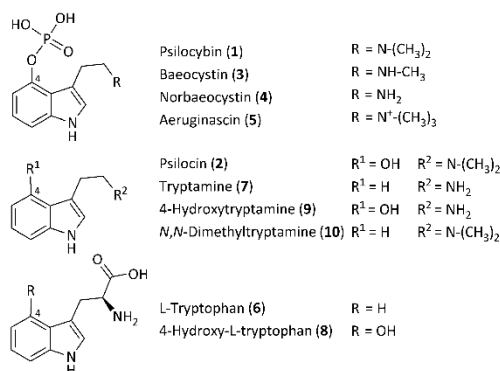
Enzymatic Synthesis of Psilocybin

Janis Fricke[†], Felix Blei[†], and Dirk Hoffmeister*

Abstract: Psilocybin is the psychotropic tryptamine-derived natural product of *Psilocybe* carpophores, the so-called “magic mushrooms”. Although its structure has been known for 60 years, the enzymatic basis of its biosynthesis has remained obscure. We characterized four psilocybin biosynthesis enzymes, namely i) *PsiD*, which represents a new class of fungal L-tryptophan decarboxylases, ii) *PsiK*, which catalyzes the phosphotransfer step, iii) the methyltransferase *PsiM*, catalyzing iterative N-methyl transfer as the terminal biosynthetic step, and iv) *PsiH*, a monooxygenase. In a combined *PsiD*/*PsiK*/*PsiM* reaction, psilocybin was synthesized enzymatically in a step-economic route from 4-hydroxy-L-tryptophan. Given the renewed pharmaceutical interest in psilocybin, our results may lay the foundation for its biotechnological production.

Numerous mushrooms of the genus *Psilocybe* produce psychotropically active natural products that profoundly change perception when ingested. For centuries, Central American cultures considered these mushrooms divine and have used them for spiritual purposes. More recently, the carpophores have been used as recreational drugs (colloquially dubbed “magic mushrooms”). The pharmacological effects are caused by modified tryptamines,^[1] with psilocybin (**1**, Scheme 1) being the major chemical constituent of these fungi.^[2] This prodrug-like natural product becomes rapidly dephosphorylated upon oral ingestion to yield the actual psychotropic agent psilocin (**2**), which primarily acts as a partial agonist on the 5HT_{2A} receptor in the human central nervous system.^[1] Compound **1** has attracted pharmaceutical attention as clinical studies showed a positive trend in the treatment of existential anxiety with advanced-stage cancer patients and for nicotine addiction.^[3] Studies on the clinical use of **1** against depression are ongoing.^[4]

Hofmann and co-workers elucidated the structures of **1** and **2** in 1959.^[2a] Later, the demethylated analogues baeocystin (**3**) and norbaeocystin (**4**) and the trimethylated variant aeruginascin (**5**) were described (Scheme 1).^[5] The order of biosynthetic events leading to **1**, with its unique 4-phosphoryloxy group at the indole framework, was published in 1968, based on ¹⁴C and ³H radiotracer labeling.^[6] It was proposed that L-tryptophan (**6**) first undergoes decarboxylation to yield tryptamine (**7**), which is followed by



Scheme 1. Chemical structures of *Psilocybe* natural products and enzyme substrates.

successive N,N-dimethylation, C4 hydroxylation, and 4-O-phosphorylation.

Herein, we report on the enzymes for the biosynthesis of **1** in *P. cubensis*, which include an L-tryptophan decarboxylase, a kinase, an S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent N-methyltransferase, and a monooxygenase. Our results reveal that the biosynthesis does not follow the above order. Using heterologously produced enzymes and 4-hydroxy-L-tryptophan (**8**) as the substrate, we reconstituted the biosynthetic pathway of **1** in vitro. We identified a new class of fungal L-tryptophan decarboxylases, and provide evidence that N,N-dimethylation is the final step. We therefore present a refined biosynthetic pathway for **1**.

The genomes of *P. cubensis* and *P. cyanescens* were sequenced. In fungi, genes encoding a particular biosynthesis are usually co-localized in contiguous gene clusters, in most cases around genes encoding polyketide synthases, peptide synthetases, or terpene cyclases.^[7] The biosynthesis of compound **1** does not require such genes. Also, it was elusive whether a gene for an aromatic L-amino acid decarboxylase, such as CstDC,^[8] was present in the cluster as the respective enzyme activity is required for primary metabolism as well. Instead, only genes for a methyltransferase, a hydroxylase, and a kinase are expected for the biosynthesis of **1**. In either genome, a locus (*P. cubensis*: 21.8 kb; *P. cyanescens*: 25 kb) was identified that included the expected genes (hereafter referred to as *psiM*, *psiH*, and *psiK*; Figure 1 and the Supporting Information, Table S1), alongside a putative decarboxylase gene (*psiD*). Genes for major facilitator family transporters (*psiT1* and *psiT2*) and a helix loop helix (HLH) domain transcriptional regulator (*psiR*) were also found.

[*] J. Fricke,[†] F. Blei,[†] Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmaceutical Microbiology at the Hans Knöll Institute
Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/anie.201705489>.

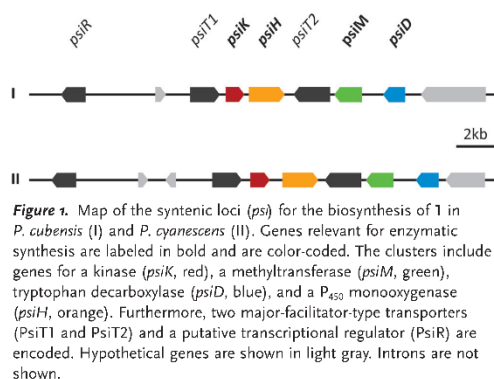


Figure 1. Map of the syntenic loci (*psi*) for the biosynthesis of **1** in *P. cubensis* (I) and *P. cyanescens* (II). Genes relevant for enzymatic synthesis are labeled in bold and are color-coded. The clusters include genes for a kinase (*psiK*, red), a methyltransferase (*psiM*, green), tryptophan decarboxylase (*psiD*, blue), and a P_{450} monooxygenase (*psiH*, orange). Furthermore, two major-facilitator-type transporters (*psiT1* and *psiT2*) and a putative transcriptional regulator (*psiR*) are encoded. Hypothetical genes are shown in light gray. Introns are not shown.

Most basidiomycetes are not amenable to genetic manipulation, which precludes reverse genetic strategies or gene silencing.^[9] Therefore, we followed an in vitro approach to provide evidence that these loci govern the biosynthesis of compound **1**. Given the high degree of similarity of the predicted enzymes encoded in *P. cubensis* and *P. cyanescens* (between 78 and 85% identical amino acids), we chose *P. cubensis* as our model. The cDNAs of *psiD*, *psiK*, and *psiM* were cloned to create the expression plasmids pJF24, pJF23, and pFB13. They were used to individually transform *Escherichia coli* KRX and produce N-terminal hexahistidine fusion proteins, which were purified by metal affinity chromatography (Figure S1).

PsiD is a 49.6 kDa enzyme (439 amino acids in its native form, calculated pI 5.3) that belongs to the PLP-independent phosphatidylserine decarboxylase family (E.C. 4.1.1.65) and is most similar to hypothetical proteins of other basidiomycetes, such as from *Fibulorhizoctonia* sp. (GenBank accession: KZP09902.1, 60% identical amino acids) and *Moniliophthora roreri* (XP_007857499.1, 52% identical amino acids). PsiD is not related to PLP-dependent aromatic L-amino acid decarboxylases (E.C. 4.1.1.28, Figure S2)^[8,10] but related to phosphatidylserine decarboxylases.^[11] LC-MS analyses showed product formation when **6** was added as a substrate (Figure 2A). Surprisingly, compound **8** was accepted as a substrate by PsiD as well. Fractions with the typical indole UV/Vis spectrum appeared at retention times of $t_R = 14.0$ min in the reaction with **6** and $t_R = 9.8$ min with **8**. These signals corresponded to the masses of **7** and 4-hydroxytryptamine (**9**; Figure 2A and Table S2). Therefore, we identified PsiD as a plausible enzyme for the biosynthesis of **1** that belongs to a class of decarboxylases for which **6** has previously not been described as a substrate and that is distinct from other fungal and plant aromatic amino acid decarboxylases. Given the turnover of **8**, a step-economic three-enzyme in vitro synthesis of **1** appeared possible.

We next investigated the putative SAM-dependent methyltransferase PsiM (34.5 kDa, 309 amino acids). It is similar to other hypothetical basidiomycete methyltransferases, such as those from *Heterobasidion irregulare* (XP_009549744.1, 52% identical amino acids) and *Dichomitus squaleus*

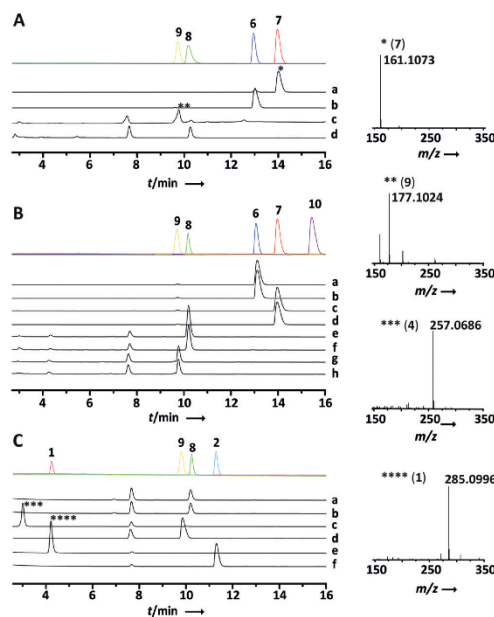


Figure 2. Chromatographic analysis of product formation by the enzymes for the biosynthesis of **1** in vitro. Chromatograms were recorded at $\lambda = 280$ nm. A) Reactions catalyzed by PsiD. Top trace (overlay of individual chromatograms): Authentic standards of **6–9**. Traces a and b: Reaction with **6** as the substrate and negative control (heat-inactivated enzyme), respectively. Traces c and d: Reaction with **8** and negative control. B) Reactions with PsiM. Top traces: Authentic standards of **6–10**. Traces a and b: Reaction with **6** and negative control, respectively. Traces c and d: Reaction with **7** and negative control. Traces e and f: Reaction with **8** and negative control. Traces g and h: Reaction with **9** and negative control. C) Reactions with PsiK. Top traces: Authentic standards of **1, 2, 8**, and **9**. Traces a and b: Reaction with **8** and negative control, respectively. Traces c and d: Reaction with **9** and negative control. Traces e and f: Reaction with **2** and negative control. The signals at 7.7 min occurring both in the negative controls and enzyme-containing reactions are caused by 1,4,5-oxadithiepane, which is formed owing to the presence of β -mercaptoethanol. HRMS spectra for HPLC signals of the compounds given in parentheses are shown on the right.

(XP_007367644.1, 50% identical amino acids). PsiM is a class I methyltransferase featuring a Rossmann fold, with the sequence ¹⁰³G-V-D-I-G-T-G-A-S¹¹¹ representing a plausible fold core.^[12] Based on the proposed order of biosynthesis events towards **1**,^[6] PsiM was expected to catalyze iterative methyl transfer to the amino group of **7** to yield *N,N*-dimethyltryptamine (**10**). Mechanistic considerations made **6** unlikely as a substrate as the decarboxylation step requires a primary amine for Schiff base formation. Assays containing SAM and **6, 7, 8**, or **9** were analyzed by LC-MS. However, mono- or dimethylated products were not detected (Figure 2B), and the use of **9** as the substrate resulted only in product traces. A combined PsiD/PsiM assay did not result in methylated products either (Figure 3). Therefore, we

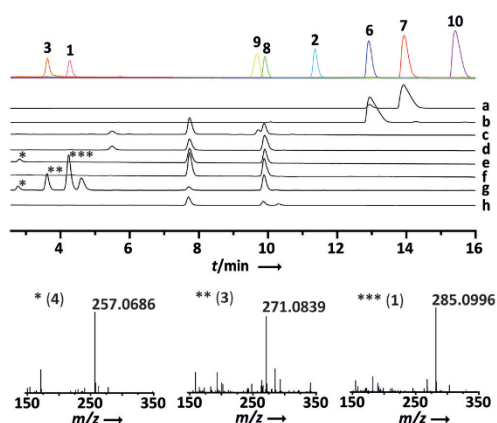


Figure 3. LC-MS analysis of coupled enzymatic assays. Chromatograms were recorded at $\lambda = 280$ nm. Top trace: Authentic standards of 1–3 and 6–10 (overlay of chromatograms). Trace a: The coupled PsiD/PsiM reaction with 6 as the substrate (trace b: negative control) and 7 as the product. Trace c: The coupled PsiD/PsiM reaction with 8 as the substrate and 9 as the product (trace d: negative control). Trace e: The coupled PsiD/PsiK reaction with 8 as the substrate and formation of 4 (trace f: negative control). Trace g: The combined PsiD/PsiK/PsiM assay (trace h: negative control) with the formation of 1, 3, and 4 in vitro. The signal at $t_R = 4.7$ min is due to S-adenosyl-L-homocysteine.

hypothesized that the phosphoryloxy group is a structural prerequisite for PsiM substrates, and we proceeded with an investigation of the phosphotransfer step.

The putative kinase PsiK (40.4 kDa, 362 amino acids) falls into the 5-methylthioribose family of small-molecule kinases. Highest similarity was found to hypothetical enzymes of *Fibulorhizoctonia* sp. (KZP10121.1, 41% identical amino acids) and *Daedalea quercina* (KZT 74976.1, 31% identical amino acids). Pure PsiK converted 2 into 1, as evident by LC-MS analysis (Figure 2C and Table S2). Comparison with an authentic psilocybin standard showed identical retention times. When 8 was added as substrate, product formation was not detected. This result indicated rejection of this compound by PsiK and that a decarboxylated substrate is required. When 9 was offered as substrate, the formation of 4 was observed (Figure 2C). To confirm the requirement for a decarboxylated substrate and to simultaneously establish another step in the enzymatic synthesis, a coupled PsiD/PsiK assay with 8 as the substrate was run, which resulted in the formation of 4, as shown by LC-MS analysis (Figure 3 and Table S2). We therefore describe PsiK as the dedicated kinase that catalyzes the 4-O-phosphorylation step in the biosynthesis of 1.

PsiK is one of very few biochemically characterized natural product kinases, among them those for paeninodine and calyculin biosynthesis.^[13] To show methyltransferase activity and to add the third step to our enzymatic approach for the synthesis of 1, a triple PsiD/PsiK/PsiM assay was subsequently set up, using 8 as the substrate. LC-MS analysis unequivocally confirmed the formation of a product that was

identical in retention time, UV/Vis, and mass spectra to an authentic sample of 1 (Figure 3, trace g; Figure 4). A subsequent scaled-up assay with 15 μ mol (3.3 mg) of 8 as the starting material yielded 3.9 μ mol of 1.

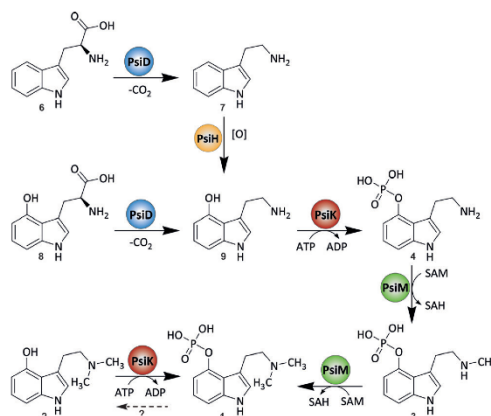


Figure 4. Production of 1 i) according to the in vitro enzymatic route from 8 and ii) biosynthetically in *P. cubensis* starting from 6. The dashed arrow from 1 to 2 symbolizes hypothetical intracellular dephosphorylation.

Minor amounts of 3 and 4 were detected as well. Therefore, we concluded that compound 4 is the main PsiM substrate, which is produced by PsiD and PsiK and then processively N,N-dimethylated to yield 1. Our results therefore imply that 2 may not be a true substrate towards 1. Given that PsiK readily turns over 2 into 1, we propose that this activity represents a protective mechanism to re-phosphorylate the instable compound 2 to the stable 1 in the case of intracellular ester cleavage (Figure 4).

Iterative methyl transfer to small molecules by enzymes has been investigated previously, and RemG was shown to catalyze geminal C-dimethylation during resistomycin assembly.^[14] Furthermore, the mycobacterial methyltransferase EgtD processively catalyzes N-trimethylation of the L-histidine amino group during ergothioneine biosynthesis, and the enzyme structure has also been solved.^[15] However, EgtD and PsiM are not closely related as the former is a member of the methyltransferase family 33, whereas the latter falls into family 10. Similarly, PsiM is unrelated to mammalian indolcthylamine-N-methyltransferase.^[16]

In an earlier study,^[17] it had already been speculated that compound 3 might be a precursor of 1, which has now been confirmed by our present work. In addition, it was hypothesized^[5a,6] that *P. cubensis* may hydroxylate early, that is, in a mammalian serotonin-like order of biosynthetic events.^[18] Given the PsiD flexibility towards 8, it appeared plausible that decarboxylation and 4-hydroxylation may be interchangeable steps. To elucidate the hydroxylation event, the P₅₀ monooxygenase PsiH was produced heterologously in *Aspergillus niger* tJF02.05. The conversion of 6 or 7, added to

the culture, into **8** or **9**, respectively, was investigated by LC-MS (Figure S3). Whereas compound **8** was not detected, conversion of **7** into **9** was observed. As the hydroxylation of N-alkylated tryptamines has been demonstrated already,^[17] compound **10** may serve as a PsiH substrate that would yield **2** as an intermediate. The fungus, however, precludes this route by the strict specificity of PsiM. We have therefore demonstrated that the biosynthesis of **1** is a virtually linear process (Figure 4), initiated by PsiD-catalyzed decarboxylation as a gateway step. Compound **2** occurs as a minor species in *Psilocybe* carpophores, and is probably due to intracellular dephosphorylation that is not fully compensated by PsiK. Nonenzymatic conversion of **1** into **2** during isolation may additionally increase the apparent concentration of **2**.

Our findings set the stage for the heterologous production of psilocybin (**1**) with engineered microbial hosts in a controlled environment for pharmaceutical purposes, should the rediscovered pharmaceutical value lead to increased demands.

Acknowledgements

We thank J. Greßler, J. Wick (both Friedrich-Schiller-Universität Jena), and A. Perner (Hans-Knöll-Institut Jena) for cDNA synthesis, providing psilocybin, and recording high-resolution mass spectra, respectively. D.H. is authorized to handle compounds that are controlled by the Narcotics Act of the Federal Republic of Germany. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant HO2515/7-1 to D.H.).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: biosynthesis · enzymes · kinases · natural products · psilocybin

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12352–12355
Angew. Chem. **2017**, *129*, 12524–12527

- [1] a) D. E. Nichols, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *101*, 131–181; b) F. Hasler, U. Grimberg, M. A. Benz, T. Huber, F. X. Vollenweider, *Psychopharmacology* **2004**, *172*, 145–156.

- [2] a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572; b) A. Y. Leung, A. H. Smith, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 1576–1579.
- [3] a) C. S. Grob, A. L. Danforth, G. S. Chopra, M. Hagerty, C. R. McKay, A. L. Halberstadt, G. R. Greer, *Arch. Gen. Psychiatry* **2011**, *68*, 71–78; b) M. W. Johnson, A. Garcia-Romeu, M. P. Cosimano, R. R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2014**, *28*, 983–992.
- [4] A. Mahapatra, R. Gupta, *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **2017**, *7*, 54–56.
- [5] a) A. Y. Leung, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1667–1671; b) D. B. Repke, D. T. Leslic, *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 113–114; c) N. Jensen, J. Gartz, H. Laatsch, *Planta Med.* **2006**, *72*, 665–666.
- [6] a) S. Agurell, J. L. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 1210–1218; b) S. Agurell, J. L. Nilsson, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 1063–1064.
- [7] D. Hoffmeister, N. P. Keller, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 393–416.
- [8] D. Kalb, J. Gressler, D. Hoffmeister, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 132–136.
- [9] M. Stadler, D. Hoffmeister, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 127.
- [10] M. P. Torrens-Spence, M. Lazear, R. von Guggenberg, H. Ding, J. Li, *Phytochemistry* **2014**, *106*, 37–43.
- [11] a) D. Rontein, W. I. Liu, D. R. Voelker, A. D. Hanson, *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1678–1687; b) I. Schuiki, G. Daum, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 151–162.
- [12] a) R. M. Kagan, S. Clarke, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *310*, 417–427; b) P. Z. Kozbial, A. R. Mushegian, *BMC Struct. Biol.* **2005**, *5*, 19.
- [13] a) S. Zhu, C. D. Fage, J. D. Hegemann, D. Yan, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 13662–13678; b) T. Wakimoto, Y. Egami, Y. Nakashima, Y. Wakimoto, T. Mori, T. Awakawa, T. Ito, H. Kenmoku, Y. Asakawa, J. Picl, I. Abe, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 648–655.
- [14] K. Ishida, K. Fritzsche, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12648–12649.
- [15] a) A. Vit, L. Misson, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 119–125.
- [16] a) J. Axelrod, *Science* **1961**, *134*, 343; b) M. A. Thompson, R. M. Weinshilboum, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34502–34510.
- [17] J. Gartz, *J. Basic Microbiol.* **1989**, *29*, 347–352.
- [18] W. Lovenberg, H. Weissbach, S. Udenfriend, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 89–93.

Manuscript received: May 29, 2017

Accepted manuscript online: August 1, 2017

Version of record online: August 25, 2017



Supporting Information

Enzymatic Synthesis of Psilocybin

*Janis Fricke⁺, Felix Blei⁺, and Dirk Hoffmeister**

anie_201705489_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of Contents

Experimental procedures	2
Table S1. Length and number of introns of Psilocybin biosynthetic genes	5
Table S2. Retention times and masses of <i>P. cubensis</i> natural products	6
Table S3. Oligonucleotide primers.....	7
Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of biosynthesis enzymes PsiD, PsiM, and PsiK	8
Figure S2. Phylogeny of decarboxylases	9
Figure S3. In vivo hydroxylation by <i>Aspergillus niger</i> pJF02	10
Figure S4. Genetic characterization of <i>Aspergillus niger</i> pJF02	11
Figure S5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of monooxygenase PsiH.....	12
Figure S6. MS/MS-characterization of norbaeocystin	13
References	14

Experimental Procedures

Microbiological methods: Monokaryotic strains *Psilocybe cubensis* FSU12409 and *P. cyanescens* FSU12416 were routinely grown on malt extract peptone (MEP) solid medium (30 g L⁻¹ malt extract, 3 g L⁻¹ peptone, 18 g L⁻¹ agar, pH 5.6) at 25°C. For extraction of chromosomal DNA, the fungi were grown in liquid MEP medium, shaken at 120 rpm, and the mycelium was collected after 14 d, dried, and ground up in liquid nitrogen with mortar and pestle. RNA was extracted from fruiting bodies, grown on a mixture of potting soil/bark humus/perlite.

Genomic sequencing and sequence analysis: Genomic DNA of *P. cubensis* and *P. cyanescens* was isolated following a described protocol^[1] and sequenced using Illumina MiSeq and PacBio RSII technology, respectively. The sequences were assembled de novo using SPAdes and Velvet software.^[2,3] The *P. cubensis* sequences yielded a 2939-contig assembly covering 41.3 Mb, the *P. cyanescens* sequences were assembled into 217 contigs covering 61.3 Mb. Gen models were predicted with Augustus,^[4] similar protein sequences were identified using BlastP.^[5] To align amino acid sequences of decarboxylases and to build a phylogenetic tree, Geneious software (version 7.1.9, Biomatters, Ltd.) was used. Sequences were compared by Geneious Alignment of the type global alignment with free end gaps. The phylogenetic network was created with the genetic distance model by Jukes and Cantor^[6] and the neighbor-joining method, implemented in the Geneious Tree Builder. The genomic sequences of *P. cubensis* and *P. cyanescens* can be accessed via the following URLs:

http://www.pharmazie.uni-jena.de/phamedia/AG+Prof.+Dr.+Dirk+Hoffmeister/genome_FSU_12409.fasta

http://www.pharmazie.uni-jena.de/phamedia/AG+Prof.+Dr.+Dirk+Hoffmeister/genome_FSU_12416.fasta

cDNA synthesis: Total *P. cubensis* RNA was isolated from carpophores and carried out using essentially following the instructions of the manufacturer of the kit and the enzymes (Promega SV Total RNA Isolation System). First strand cDNA synthesis was primed with oligo-d(T)-primers. Using the first strand reaction as template, full length cDNAs were amplified by PCR. The reaction (50 µL) included 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgSO₄, and 0.2 µM (each) primer (sequences shown in Table S3) in HF buffer that was supplied with the enzyme (Phusion DNA polymerase, 1 U). Primers were oJF51/oJF52 to amplify *psiD*, oJF42/oJF43 to amplify *psiK*, oJF46/oJF47 to amplify *psiM*, and oJF48/oJF49 to amplify *psiH*, respectively. For PCR, after an initial hold at 98°C for 1 min, thermal cycling conditions I, II, III, and IV were applied to amplify *psiD*, *psiK*, *psiM*, and *psiH*, respectively.

Condition I: 6 cycles of 98°C for 1 min, 54°C for 15 s, 72°C for 1 min, followed by 30 cycles of 98°C for 1 min, 68.5°C for 15 s, and 72°C for 1 min.

Condition II: 6 cycles of 98°C for 1 min, 57°C for 15 s, 72°C for 1 min, followed by 30 cycles of 98°C for 1 min, 70°C for 15 s, and 72°C for 1 min.

Condition III: 6 cycles of 98°C for 1 min, 51°C for 15 s, 72°C for 1 min, followed by 30 cycles of 98°C for 1 min, 68°C for 15 s, and 72°C for 1 min.

Condition IV: 6 cycles of 98°C for 1 min, 61°C for 15 s, 72°C for 1 min, followed by 30 cycles of 98°C for 1 min, 70°C for 15 s, and 72°C for 1 min.

A terminal hold at 72°C for 5 min was added for all reactions.

Construction of expression plasmids: The PCR products of *psiD*, *psiK*, and *psiM* were purified by gel electrophoresis, restricted with *Bam*HI and *Hind*III (*psiM*: *Bam*HI and *Xho*I) and ligated to the expression vector pET28a, restricted with the respective enzymes, to yield plasmids pJF24, pJF23, and pFB13, to produce *N*-terminally hexahistidine-tagged fusion proteins of PsiD, PsiK, and PsiM, respectively. The PCR product of *psiH*

was purified by gel electrophoresis and ligated to the NcoI-linearized expression vector pSM-Xpress^[7] using the In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) to yield plasmid pJF25 for *Aspergillus niger* transformation.

Heterologous protein production in *E. coli*: For heterologous expression of *psiD*, *psiK*, and *psiM*, *E. coli* KRX was transformed with expression plasmids pJF24, pJF23, and pFB13, respectively. Transformants were grown overnight in 5 mL LB-medium, amended with kanamycin (50 mg mL⁻¹), as a seed culture to inoculate a 400 mL of the same medium and antibiotic as production culture, which was incubated at 180 rpm and 37°C on an orbital shaker to an OD₆₀₀ of 0.5. Gene expression in the respective transformants was induced by adding 0.1 % (w/v) L-rhamnose. Cultivation proceeded for 16 h. The biomass was collected by centrifugation (4°C, 1,200 x g, 20 min). The pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄ × H₂O, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) followed by ultrasonic cell disruption. Cell debris was removed by subsequent centrifugation at 4°C and 14,000 x g for 15 min. The proteins PsiD, PsiK, and PsiM were separately purified by metal affinity chromatography on Protino Ni²⁺-NTA resin (Macherey&Nagel). The pure proteins were desalted on PD-10 columns (GE Healthcare), equilibrated and eluted with phosphate buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7.4). Purification was verified by polyacrylamide gel electrophoresis (12% Laemmli gel, Figure S1). The protein concentration was determined by Bradford's method.^[8]

Characterization of enzymes in vitro: All in vitro reactions were carried out in triplicate, set up in phosphate buffer (50 mM; NaH₂PO₄, pH 7.4, which is the pH value of optimal or near-optimal activity of all three enzymes). If a 4-hydroxylated substrate was present, 5 mM β-mercaptoethanol was added. The enzyme concentration was 200 nM throughout, in case of combined assays, each enzyme was added at this concentration. The reactions proceeded for 2 h at 25°C, before they were lyophilized.

Single-enzyme assays: The reaction volume was 100 µL (200 µL for PsiK). In the PsiD assay, L-tryptophan or 4-hydroxy-L-tryptophan was added as substrates (2.5 mM final concentration). To assay for PsiK activity, ATP and MgCl₂ (5 mM each) and either L-tryptophan, 4-hydroxy-L-tryptophan (2.5 mM), or 4-hydroxytryptamin (4 mM) were added. Substrates in the PsiM assay were either L-tryptophan, tryptamine, 4-hydroxy-L-tryptophan, or 4-hydroxytryptamin (2.5 mM). The S-adenosyl-L-methionine (SAM) concentration was 5 mM. After lyophilization, the residue was dissolved in H₂O:acetonitrile (ACN, 9:1, v/v), filtered, and used for chromatography (see below).

Dual-enzyme assays and triple-enzyme enzymatic synthesis of psilocybin: The reaction volume was 400 µL. The combined PsiD/PsiM assay included either L-tryptophan or 4-hydroxy-L-tryptophan (2.5 mM final) and SAM (5 mM final). The combined PsiD/PsiK assay was set up with 4-hydroxy-L-tryptophan (2.5 mM final), ATP, and MgCl₂ (5 mM each). The combined PsiD/PsiK/PsiM assay yielding psilocybin included 4-hydroxy-L-tryptophan (2.5 mM final), SAM, ATP, and MgCl₂ (5 mM each). After lyophilization, the residue was solved in methanol, centrifuged (4°C, 14,000 x g, 10 min), and the supernatant was collected. After the solvent was evaporated, the residue was dissolved in acetonitrile (ACN):H₂O (9:1, v/v), filtered, and used for chromatography (see below). The scaled-up PsiD/PsiK/PsiM psilocybin product formation assay was performed as above but with 3 mM final concentration of 4-hydroxy-L-tryptophan and 6 mM final concentration of other substrates in a volume of 5 mL. Psilocybin yield was determined by calculating the area under the curve of its chromatographic signal and compared to a standard curve, recorded with authentic compound.

Transformation and cultivation of *Aspergillus niger*: *A. niger* P2 was used as host for heterologous production of PsiH and was grown at 30°C and 180 rpm on *Aspergillus* minimal medium (AMM, 100 mM D-glucose, 70 mM NaNO₃, 7 mM KCl, 4.3 mM MgSO₄, 1 ml L⁻¹ Hutner's trace solution^[9] for 48 h. *A. niger* P2 protoplasts were transformed with plasmid pJF25 to create strain tJF02, following a published protocol.^[7] After 5-7 d, individual transformants were transferred onto new selective medium (AMM, amended with 60 µg mL⁻¹

phleomycin). The transfer was repeated twice. To verify *psiH* transgene insertion, genomic DNA was extracted as described^[10] and used as template for a PCR with oligonucleotides oJF48/oJF49 and applying condition IV (above). PCR products of three transformants were analyzed by agarose gel electrophoresis (Figure S4) and transformant tJF02.05 (hereafter referred to tJF02) chosen for further work. Additional evidence for successful *psiH* integration came from purification of a protein of the expected size (58.6 kDa) by immobilized metal affinity chromatography (Figure S5) on a Ni²⁺-NTA column from *A. niger* tJF02 biomass, grown under transgene-inducing conditions (below). The biomass (10 g wet weight) was lyophilized and ground under liquid nitrogen. Then, the biomass was resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄ × H₂O, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0). The supernatant with soluble PsiH enzyme was further purified on a GE Healthcare Äkta Pure FPLC instrument, equipped with a His-Trap FF crude (1 mL) nickel affinity column. A step gradient was applied by using buffer A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7.5) and buffer B (500 mM imidazole in buffer A) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Detection was at λ=280 nm. After loading the sample in 4% buffer B (20 mM imidazole) the column was washed with buffer (6 mL) at a ratio of buffer A/buffer B 92:8 (40 mM imidazole) before eluting with 100% buffer B (6 mL).

PsiH-mediated hydroxylation by transgenic *Aspergillus niger* tJF02: To induce *psiH* expression in *A. niger* tJF02, 20 mM L-glutamine was added. For repressing conditions, 1% (w/v) casamino acids was added as sole nitrogen- and carbon source. The *Aspergillus* transformants were cultivated in 2 L Erlenmeyer flasks, filled with 400 mL AMM medium. For hydroxylation of externally added substrates, 2.5 mM L-tryptophan or tryptamine was added. The intrinsic cytochrome P450 reductases of *A. niger* were used as redox partners. Untransformed *A. niger* P2 was cultivated in parallel as negative control. *Aspergillus* mycelium was harvested after 5 d by filtration, lyophilized overnight, ground using mortar and pestle, and extracted with 20 mL MeOH. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was solved in 10 mL H₂O which was then washed twice with 20 mL ethyl acetate. The aqueous phase was collected and lyophilized. Subsequently, the residue was dissolved in H₂O:ACN (9:1, v/v), filtered, and chromatographed (below).

Chromatographic analysis: HPLC-analyses were carried out on an Agilent Infinity 1260 chromatograph, equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm particle size) and interfaced with an Agilent 6130 mass detector with electrospray ionization in positive and negative mode. To analyze in vitro assays, the following conditions were used. Solvent A was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, solvent B was ACN. The flow was 1 mL min⁻¹. A linear gradient was applied: initial hold at 5% B for 1 min, increase to 19% B within 12 min, and to 100% B within further 3 min. Diode array detection was performed between λ = 200–400 nm. Chromatograms were extracted at λ = 280 nm. High-resolution mass spectrometry and MS/MS analysis was performed on a Thermo Accela liquid chromatograph with a C₁₈ column (Grom-Sil 100 ODS-0 AB, 250 × 4.6 mm, 3 μm particle size) fitted to an Exactive Orbitrap spectrometer operated in positive and negative mode by using electrospray ionization. Solvents were 0.1% formic acid (FA) in water (A) and ACN (B) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The gradient was an initial hold at 5% B for 1 min, followed by a linear increase to 100% B within 15 min.

To analyze product formation by *A. niger* tJF02, mycelial extracts were chromatographed applying a linear gradient: initial hold at 5% B for 1 min, increase to 15% B within 25 min, and to 100% B within further 3 min. The flow was 1 mL min⁻¹. Authentic standards were purchased from Abcam Scientific, Roth, Sigma-Aldrich, and THC Pharm, except psilocybin and baeocystin, which were isolated from *P. cubensis* carpophores.

Table S1. Length and number of introns of Psilocybin biosynthetic genes in *P. cubensis* and *P. cyanescens*.

gene	length (bp) ^[a]	number of introns ^[a]	cDNA length ^[a]	Predicted or verified function of gene product	GenBank accession number ^[a]
<i>psiD</i>	1426/1441	2/2	1320/1320	L-tryptophan decarboxylase	KY984101/KY984104
<i>psiH</i>	2155/2128	10/10	1527/1527	monooxygenase	MF000993/ MF000997
<i>psiK</i>	1152/1147	1/1	1089/1086	kinase	KY984099/KY984102
<i>psiM</i>	1587/1580	11/11	930/930	N-methyltransferase	KY984100/KY984103
<i>psiR</i>	1556/1619	2/2	1077/1113	transcription factor	MF000990/ MF000994
<i>psiT1</i>	1696/1696	5/5	1416/1419	transporter	MF000991/ MF000995
<i>psiT2</i>	2014/2047	8/8	1572/1587	transporter	MF000992/ MF000996

^[a] the first value refers to the respective gene of *P. cubensis*, the second to *P. cyanescens*. Values for *P. cyanescens* genes and for *psiR*, *psiT1*, and *psiT2* of *P. cubensis* are predicted, using the Augustus algorithm.^[4]

Table S2. Retention times (t_R) and masses (m/z) of *P. cubensis* natural products.

compound	t_R [min] ^[a]	m/z (found) ^[b]	m/z (calculated) ^[b]	sum formula ^[b]
norbaeocystin (4)	2.9	257.0686	257.0686	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄ P
baeocystin (3)	3.7	271.0839	271.0842	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₄ P
psilocin ^[c] (2)	11.3	205.1336	205.1335	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O
4-hydroxytryptamine (9)	9.8 (12.6) ^[d]	177.1024	177.1022	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O
psilocybin (1)	4.3	285.0996	285.0999	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄ P
tryptamine (7)	14.0 (22.8)	161.1073	161.1073	C ₁₀ H ₁₃ N ₂
4-hydroxy-L-tryptophan ^[c] (8)	10.1 (14.3)	221.0919	221.0921	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₃

^[a] using the analytical conditions described above^[b] for $[M+H]^+$ ^[c] compound is only a substrate^[d] values in parentheses refer to the chromatographic conditions applied for PsiH analysis

Table S3. Oligonucleotide primers used in this study. Bases highlighted in red represent overlaps for InFusion cloning, introduced restriction site are underlined.

name	Sequence	restriction site
oJF42	TATATAGGATCCATGGCGTTCGATCTC	<i>Bam</i> HI
oJF43	TATATAAAGCTTTTACGCAGTGGATGATTC	<i>Hind</i> III
oJF46	TATATAGGATCCATGCATATCAGAAATCCTTAC	<i>Bam</i> HI
oJF47	TATATACTCGAGCTAGAAAAGAGAGCTGAG	<i>Xho</i> I
oJF48	CACCATCACCATGGAATGATCGCTGTACTATTCTCCTT	-
oJF49	AAATCACTGCTGTTATCAGGGTCCGGATACC	-
oJF51	TATATAGGATCCATGCAGGTGATACCC	<i>Bam</i> HI
oJF52	TATATAAAGCTTCTAAGCCTTTAGAGCAGC	<i>Hind</i> III

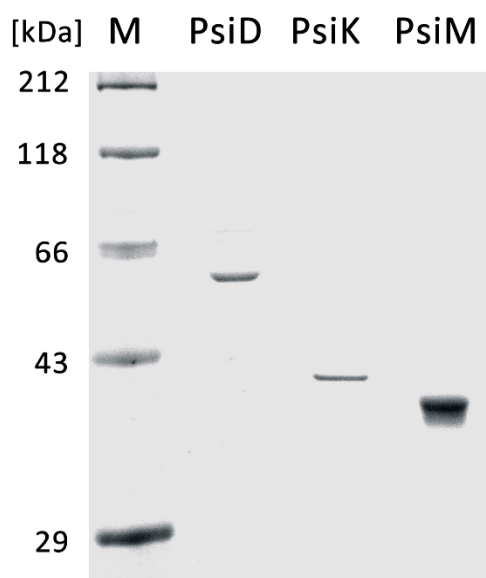


Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with recombinantly produced and purified enzymes PsiD, PsiM, and PsiK. M: Molecular weight marker, sizes are indicated.

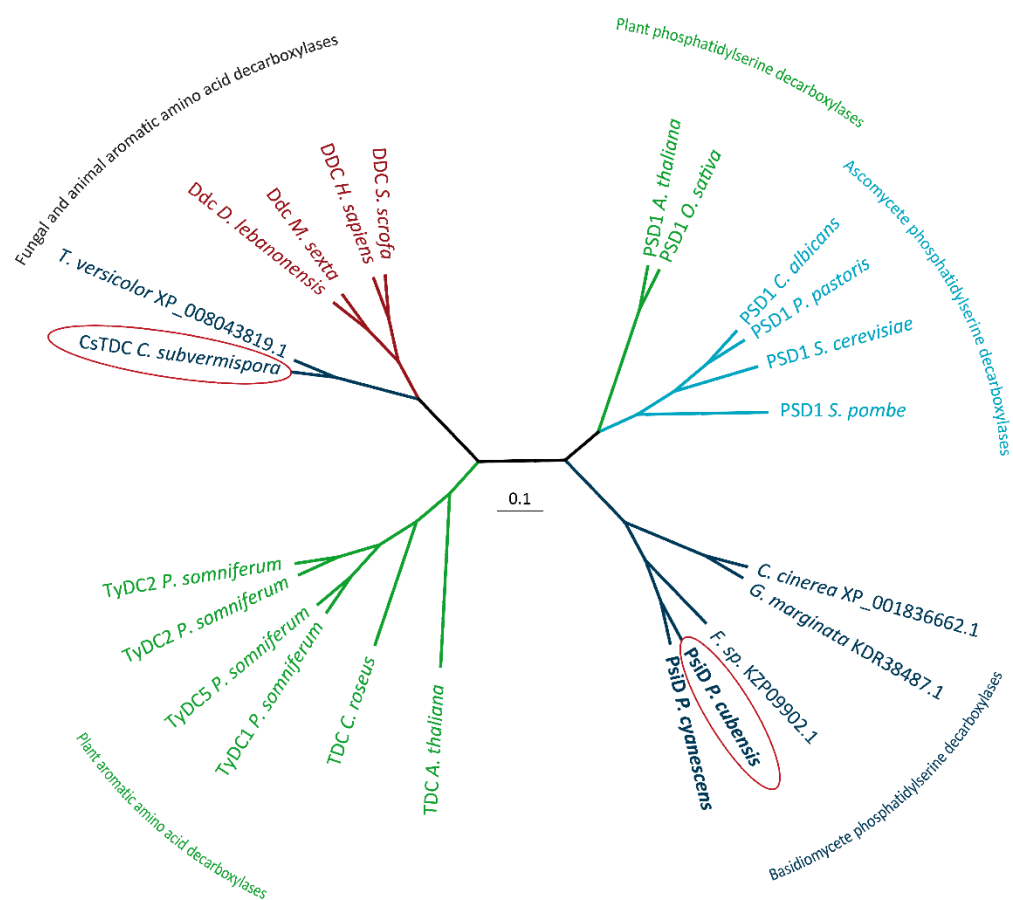


Figure S2. Phylogenetic relationship of confirmed or putative aromatic amino acid vs. phosphatidylserine decarboxylases. Fungal L-tryptophan decarboxylases whose activity was experimentally verified (CsTDC, PsiD) are highlighted with red circles. Branch lengths reflect the divergence between nodes in the tree, the scale bar

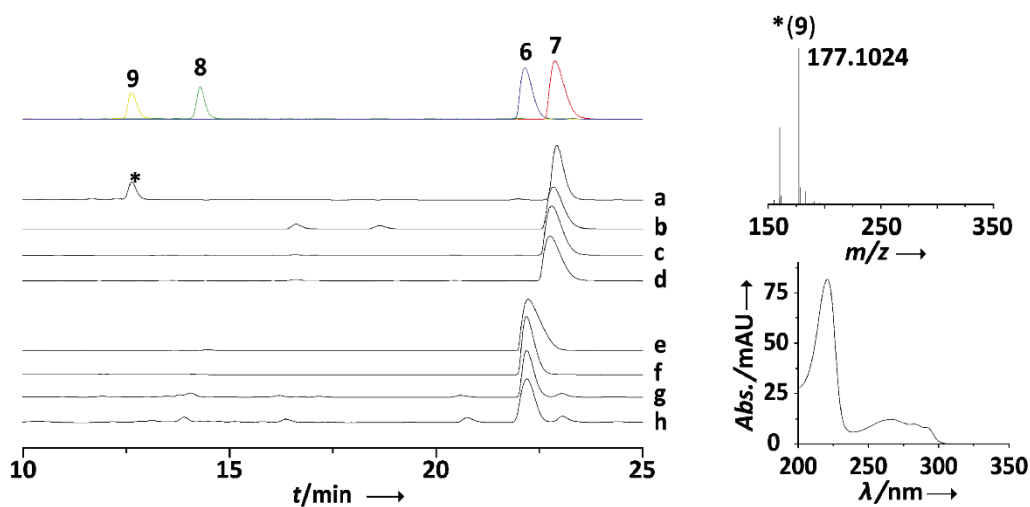


Figure S3. Chromatographic analysis of PsiH-catalyzed hydroxylation in *Aspergillus niger* tJF02.05. Top trace (overlay of individual chromatograms): authentic standards of L-tryptophan (**6**), tryptamine (**7**), 4-hydroxy-L-tryptophan (**8**), and 4-hydroxytryptamine (**9**). Traces a and b: tJF02 and negative control (untransformed *A. niger* P2), respectively, under inductive conditions in the presence of **7**. Traces c and d: tJF02 and negative control under non-inductive conditions, but in the presence of **7**. Traces e and f: tJF02 and negative control under inductive conditions, but in the presence of **6**. Traces g and h: tJF02 and negative control under non-inductive conditions, in the presence of **6**. The insets show the UV/Vis and mass spectrum of the product **9**.

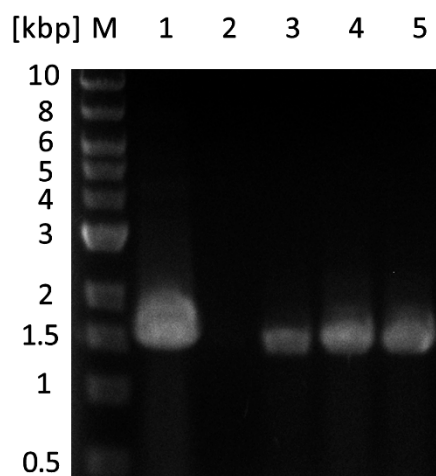


Figure S4. Agarose gel electrophoresis to verify *psiH* integration in the genome of *Aspergillus niger* pJF02. M: DNA marker, lengths in kilobasepairs (kbp) are indicated. Lane 1: positive control (PCR amplification of *psiH* with plasmid pJF25 as template). Lane 2: negative control: untransformed *A. niger* P2. Lanes 3-5: PCR amplification of *psiH* with genomic DNA and primers oJF48/oJF49 of three independent transformants (tJF02.03/tJF02.05, and tJF02.12, respectively) as template.

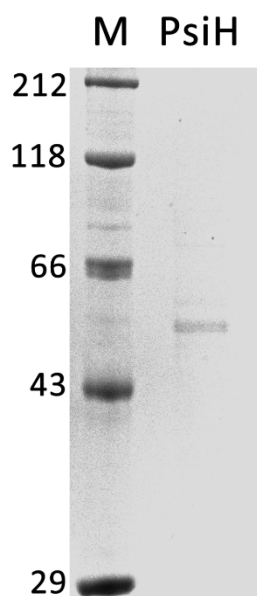


Figure S5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with PsiH, recombinantly produced in *Aspergillus niger* tJF02.05. M: Molecular weight marker, sizes are indicated.

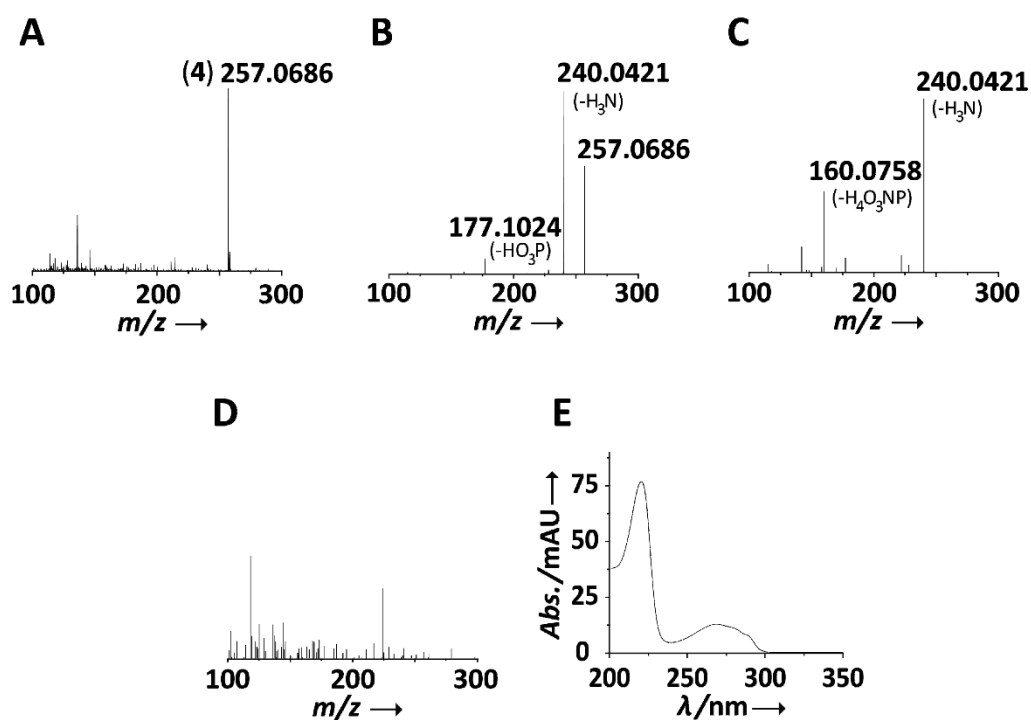


Figure S6. Characterization of norbaeocystin (4). A) High-resolution mass spectrum at $t_R=2.9$ min; B) MS/MS spectrum with 22% of the total ionization energy; C) MS/MS spectrum with 45% of the total ionization energy; D) high-resolution mass spectrum at $t_R=2.9$ min of the chromatographic run of the negative control; E) UV/Vis spectrum of 4.

References

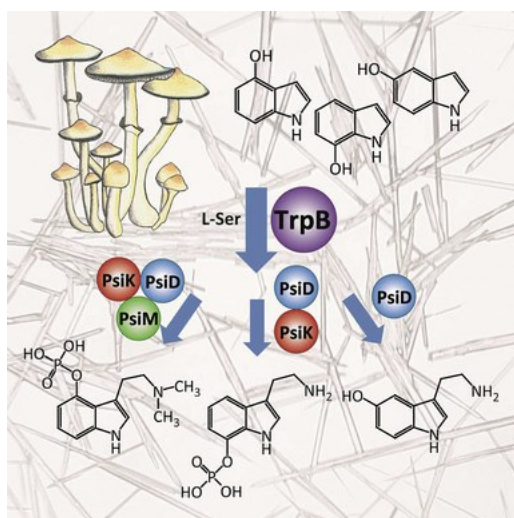
- [1] K. Shimizu, N.P. Keller, *Genetics*, **2001**, *157*, 591-600.
- [2] A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A.D. Prjibelski, A.V. Pyshkin, A.V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev, P.A. Pevzner, *J. Comp. Biol.*, **2012**, *19*, 455-477.
- [3] D.R. Zerbino, E. Birney, *Genome Res.* **2008**, *18*, 821-829.
- [4] M. Stanke, R. Steinkamp, S. Waack, B. Morgenstern, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W309-312.
- [5] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.
- [6] T.H. Jukes, C. R. Cantor, *Evolution of Protein Molecules*, Academic Press, New York, **1969**, p. 21.
- [7] M. Gressler, P. Hortschansky, E. Geib, M. Brock, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 184.
- [8] M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [9] S.H. Hutner, L. Provasoli, A. Schatz, C.P. Haskins, *Proc. Am. Philos. Soc.* **1950**, *94*, 152-170.
- [10] J. Braesel, J. Fricke, D. Schwenk, D. Hoffmeister, *Fungal Genet. Biol.* **2017**, *98*, 12-19.

3.2 Biocatalytic production of psilocybin and derivatives in L-tryptophan-synthase enhanced reactions

Felix Blei, Janis Fricke, Florian Baldeweg, Dirk Hoffmeister

Chemistry - A European Journal, Band 24, Ausgabe 40, Seiten 10028-10031, 2018

Zusammenfassung



Die Tryptophansynthase (TS) aus dem Pilz *P. cubensis* wurde heterolog in *E. coli* produziert und biochemisch charakterisiert. Es zeigte sich eine erweiterte Substratflexibilität für an Position 4-, 5- und 7-hydroxyliertes Indol. Die Flexibilität ermöglichte die leichte Herstellung von Substraten, um die Psilocybin-Biosynthese-Enzyme auf ihre Spezifität zu testen. Unter der Verwendung von 4-Hydroxyindol konnte eine Produktion von Psilocybin

in einer einzigen Reaktion gezeigt werden. Wenn 5-hydroxyliertes Substrat verwendet wurde, konnte die Produktion von Serotonin gezeigt werden und erlaubte Rückschlüsse auf die Substratspezifitäten der Kinase PsiK. Durch die Verwendung des 7-Isomers konnte die Produktion von 7-Phosphoryloxytryptamin gezeigt werden, welches ein nicht-natürliches Isomer des Norbaeocystins darstellt (Isonorbaeocystin).

Angaben zum Eigenanteil: 45 %

Herstellung Plasmide und Heterologe Genexpression, Herstellung rekombinanter Proteine und die Planung und Durchführung aller Reaktionen, Charakterisierung der TS, Analyse der Proben per HPLC, Aufreinigung Isonorbaeocystin für NMR-Analyse, Mitarbeit am Manuskript

Jena, den

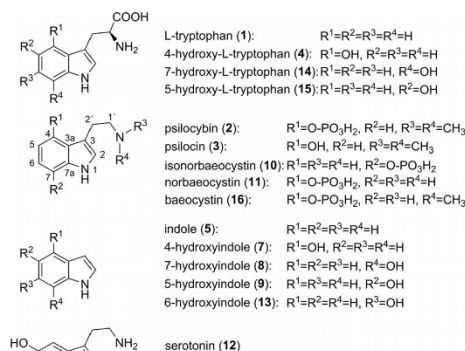
Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

Biosynthesis

Biocatalytic Production of Psilocybin and Derivatives in Tryptophan Synthase-Enhanced Reactions

Felix Blei, Florian Baldeweg, Janis Fricke, and Dirk Hoffmeister^{*[a]}

Abstract: Psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine) is the main alkaloid of the fungal genus *Psilocybe*, the so-called “magic mushrooms.” The pharmaceutical interest in this psychotropic natural product as a future medication to treat depression and anxiety is strongly re-emerging. Here, we present an enhanced enzymatic route of psilocybin production by adding TrpB, the tryptophan synthase of the mushroom *Psilocybe cubensis*, to the reaction. We capitalized on its substrate flexibility and show psilocybin formation from 4-hydroxyindole and L-serine, which are less cost-intensive substrates, compared to the previous method. Furthermore, we show enzymatic production of 7-phosphoryloxytryptamine (isonorbaecocystin), a non-natural congener of the *Psilocybe* alkaloid norbaecocystin (4-phosphoryloxytryptamine), and of serotonin (5-hydroxytryptamine) by means of the same in vitro approach.



Scheme 1. Structures of *Psilocybe* tryptophan synthase substrates and products, and products of the in vitro reconstituted indole alkaloid synthesis pathway.

Among the most prominent natural products is the L-tryptophan (1)-derived alkaloid psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine 2, Scheme 1).^[1] This major metabolite of *Psilocybe* carpophores—colloquially dubbed “magic mushrooms”—rapidly dephosphorylates upon ingestion to yield psilocin (3), which acts as the actual hallucinogen by agonistically binding primarily to the human 5HT_{2A}-receptor.^[2] Importantly, recent clinical studies plausibly underscore the potential pharmaceutical value of 2 in the treatment of nicotine addiction, anxiety with terminal-stage cancer patients, and depression.^[3]

For access to 2 and 3, various synthetic approaches have been established.^[4] Recently, a biotechnological three-enzyme route beginning from 4-hydroxy-L-tryptophan 4 to 2 has been reported. This route utilizes the *Psilocybe cubensis* enzymes PsiD, PsiK, and PsiM, which provide decarboxylase, kinase, and methyltransferase activity, respectively.^[5] We sought to enhance this enzymatic procedure by enzymatically producing 4 in situ via tryptophan synthase (E.C. 4.2.1.20), thus feeding lower-priced precursors to the process. The α -subunits of $\alpha_2\beta_2$ -

heterotetrameric bacterial tryptophan synthases catalyze the first half reaction (Figure 1), that is, the retro aldol-type cleavage of 1-(indole-3-yl)glycerol phosphate that releases D-glyceraldehyde 3-phosphate and provides indole 5 (Scheme 1) as substrate for the subsequent second half reaction. It is catalyzed by the β -subunit and includes a pyridoxal phosphate (PLP)-dependent condensation of 5 and L-serine 6 (Figure 1) into 1.^[6] Wild type or engineered prokaryotic tryptophan synthases of *Salmonella enterica* or *Pyrococcus furiosus* proved valuable in procuring β -methyl- or L-halotryptophans, respectively, via enzymatic conversion of substituted 5 and 6 (or L-threonine) by the β -subunit.^[7] A recent study showed production of

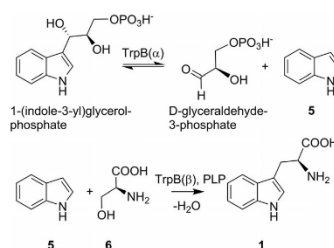


Figure 1. The tryptophan synthase reaction. Indole (5) formation is catalyzed by the α -subunit (TrpB(α)), L-tryptophan (1) production is catalyzed by the β -subunit (TrpB(β)).

[a] F. Blei, F. Baldeweg, J. Fricke, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmaceutical Microbiology at the Hans-Knöll-Institute
Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/chem.201801047>.

4-halogenated or 4-nitro tryptophan by engineered TrpB variants.^[8] Otherwise, tryptophan synthases generally showed low tolerance for 4-substituted indoles. Furthermore, hydroxy-substituted indoles, which are relevant for our purposes, had not been included in prior studies.

We recombinantly produced *P. cubensis* L-tryptophan synthase (TrpB). Here, we report on integrating it into a one-pot procedure to synthesize **2** from **6** and 4-hydroxyindole (**7**), that is, two inexpensive compounds, in four enzymatic steps, using enzymes of the same fungus. Choosing 7-hydroxyindole (**8**) and 5-hydroxyindole (**9**), we further describe an enzymatic synthesis for isonorbaecocystin (7-phosphoryloxytryptamine **10**), that is, a non-natural isomer of the psilocybin-family alkaloid norbaecocystin **11** (Scheme 1). We also show TrpB/PsiD-catalyzed synthesis of serotonin (**12**) in two enzymatic steps.

Typically, fungal tryptophan synthases are homodimers. Each monomer is bifunctional, includes an α - and a β -domain, and shows a mass of about 75 kDa.^[9] Using known fungal TrpB sequences as a reference,^[10] we identified a 2648 bp candidate gene in the genome of *P. cubensis*^[5] that was disrupted by ten introns, according to an in silico analysis with Augustus software.^[11]

The 2103 bp coding sequence encodes a 700 aa TrpB monomer (calculated molecular mass 75.5 kDa, calculated pI 5.9). The protein was most similar (85% identical aa) to predicted proteins of the mushrooms *Hebeloma cylindrosporum* (accession # KIM48772.1) and of *Galerina marginata* (KDR73575.1). The *trpB* cDNA was inserted into expression vector pET28a to create plasmid pFB14. It was used to transform *E. coli* KRX to produce TrpB as N-terminally tagged polyhistidine fusion protein (Figure S1 in the Supporting Information).

Optimum turnover took place at pH 8.0 and at 30 °C. TrpB followed Michaelis–Menten kinetics and showed K_m values of 40 μM and 16 μM for **5** and **7**, respectively, and 2.9 mM for **6** (Figure S2, Supporting Information). The values for **5** and **6** are comparable with prior data.^[7b,9] Gel permeation chromatography confirmed the dimeric state of active TrpB (Figure S3). The TrpB substrate specificity was assessed using **7**, **8**, **9**, or 6-hydroxyindole **13** (Figure 2). Indoles **7**, **8**, and **9** were converted to 4-, 7-, and 5-hydroxy-L-tryptophan (compounds **4**, **14**, and **15**, respectively, at t_R = 10.2, 9.8, and 7.9 min), as determined by LC-MS (Figure 2, found masses m/z 221.0920, 221.0930, and 221.0927 $[M+H]^+$, respectively, calculated for $C_{11}H_{13}N_2O_3$: 221.0926). Product formation was not detected in the reaction with **13**, a signal with the expected mass and UV/Vis spectrum was not found.

Next, we extended the described PsiD/PsiK/PsiM-dependent **2** in vitro synthesis by adding TrpB and PLP to this multi-enzyme assay. Substrates **6** and **7** were initially present at 3 mM, and the reaction proceeded for 4 h. LC-MS analysis unequivocally proved **2** production, along with its immediate natural precursors baecocystin (**16**) and **11** (Figure 3, Figure 4).

The substrate tolerance of the Psi enzymes outside the **2** biosynthesis pathway has not been investigated in greater detail. Considering that **15** was a TrpB product, we re-ran the four-enzyme reaction, this time adding 3 mM **6** and **9** as respective substrates. LC-MS-analysis demonstrated that a

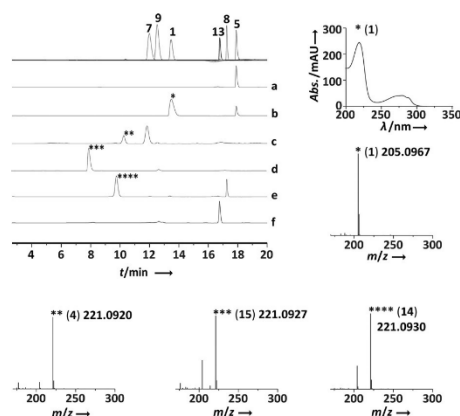


Figure 2. Product formation by *Psilocybe cubensis* TrpB. Chromatograms were extracted at $\lambda = 280$ nm, HR-ESIMS spectra of the compounds given in parentheses were recorded in positive mode, experimentally determined masses are indicated in the spectra. The calculated mass of **4**, **14**, and **15** is m/z 221.0926 $[M+H]^+$, the calculated mass of **1** is m/z 205.0972. Top trace: overlaid separate chromatograms of authentic standards. Trace a: negative control with heat-treated TrpB and **5**. Trace b: reaction with **6** and **5**. Trace c: reaction with **6** and **7**. Trace d: reaction with **6** and **9**. Trace e: reaction with **6** and **8**. Trace f: reaction with **6** and **13**.

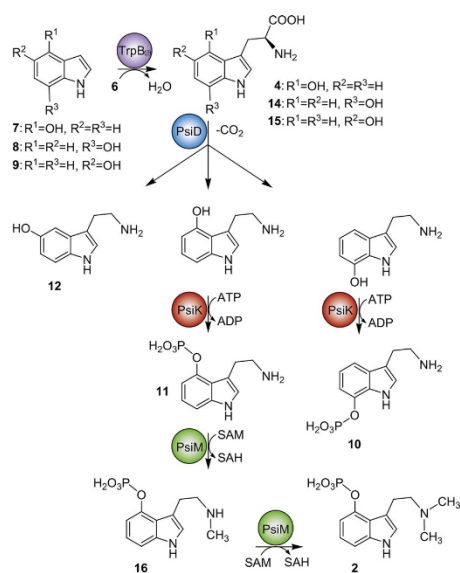


Figure 3. In vitro syntheses leading to serotonin (**12**), psilocybin (**2**), or isonorbaecocystin (**10**). The reactions included *Psilocybe cubensis* enzymes TrpB, PsiD, PsiK, and PsiM.

product had formed (t_R = 7.4 min) whose mass suggested the loss of CO_2 (m/z 177.1022 $[M+H]^+$) hence implying **15** forma-

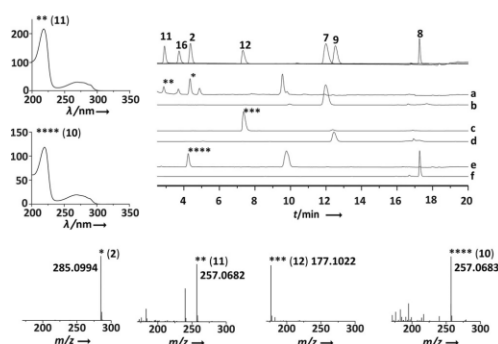


Figure 4. LC-MS analysis of product formation in multi-enzyme assays. Chromatograms were extracted at $\lambda = 280$ nm, HR-ESIMS spectra were recorded in positive mode, experimentally determined masses are indicated in the spectra. The calculated mass ($[M+H]^+$) of **2** is m/z 285.0999, of **10** and **11**: m/z 257.0686, of **12**: m/z 177.1022. Top trace: overlaid separate chromatograms of standards. Trace a: Reaction with TrpB, PsiD, PsiK, and PsiM and substrates **6** and **7**. The signal at $t_R = 4.8$ min is due to *S*-adenosyl-L-homocysteine. Trace b: negative control. Trace c: Reaction with TrpB and PsiD with substrates **6** and **9** (trace d: negative control). Trace e: Reaction with TrpB, PsiD, PsiK, and PsiM with substrates **6** and **8** (trace f: negative control). Signals at $t_R = 9.7$ and 9.6 min in traces a and e, respectively, represent intermediates **4**- and **7**-hydroxytryptamine, as identified by their UV/Vis spectra and by mass spectrometry (m/z 177.1 $[M+H]^+$).

tion and subsequent quantitative PsiD-catalyzed decarboxylation into **12**. This was confirmed by comparison with an authentic **12** standard. This finding further suggested that PsiD tolerates well the 5-hydroxy substitution, which confirmed a previous report.^[12] The results also showed that 5-hydroxylated indoles do not serve as substrates for the kinase PsiK, as no second, that is, phosphorylated product was detectable. Assays run only with TrpB and PsiD resulted in identical chromatograms (Figure 4).

We repeated the four-enzyme reaction with **6** and **8**. LC-MS analysis indicated formation of a product whose UV/Vis spectrum and mass (m/z 257.0682 $[M+H]^+$) were equal to that of **11** (Figure 4, $t_R = 2.9$ min), but which differed in its retention time ($t_R = 4.2$ min), thus pointing to an isomeric product. Assuming that PsiD tolerates the 7-hydroxy group and that PsiK accepts it as phosphate acceptor substrate, we hypothesized that this product was identical to 7-phosphoryloxytryptamine **10** (Scheme 1). We chromatographically purified this compound from an upscaled assay, which yielded 2.36 mg of pure substance.

1D and 2D NMR spectra (Table 1, Figures S4–S9 in the Supporting Information) were recorded and compared to NMR data of **2** (Table 2, Figures S4 and S10–S14). In **10**, the bridgehead carbon C-3a was identified by HMBC correlations with H-1 and H-2, while C-7a was correlated to H-2. The HMBC correlation between carbons C-3a and C-7 with the H-5 triplet established the position of the phosphoryloxy group at C-7 (Figure S9). The signal at $\delta = 7.31$ ppm (H-4) showed HMBC correlations with C-3, C-6, and C-7a, thus providing final evidence for the structure of compound **10**, for which we propose the

Table 1. ^1H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz) NMR data for **10** in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$.

Pos.	δ_{H} [ppm] (mult. J [Hz])	δ_{C} [ppm]	HMBC	COSY
1	10.97 (s, 1 H)	–	3, 3a	2
2	7.20 (d, 2.0, 1 H)	123.9	3, 3a, 7a	1
3	–	109.9	–	–
3a	–	129.5	–	–
4	7.31 (d, 7.86, 1 H)	113.8	3, 6, 7a	5
5	6.95 (t, 7.77, 1 H)	118.7	3a, 7	4, 6
6	7.02 (d, 7.68, 1 H)	111.3	4, 7a, 7	5
7	–	137.8	–	–
7a	–	128.2	–	–
1'	3.07 (m, 2 H)	39.3 ^[a]	3	2', NH ₂
2'	2.97 (t, 7.62, 2 H)	23.2	1', 2, 3, 3a	1'
NH ₂	7.75 (s, 2 H)	–	–	1'

[a] value derived from 2D ^1H - ^{13}C correlation spectrum (HMBC).

Table 2. ^1H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz) NMR data for **2** in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$.

Pos.	δ_{H} [ppm] (mult. J [Hz])	δ_{C} [ppm]	HMBC	COSY
1	11.09 (s, 1 H)	–	3, 3a	2
2	7.18 (d, 1.98, 1 H)	123.7	3, 3a, 7a	1
3	–	108.2	–	–
3a	–	118.7	–	–
4	–	145.2	–	–
5	7.12 (d, 7.98, 1 H)	107.6	3a, 7	6
6	6.99 (t, 7.74, 1 H)	121.5	7a, 4	5, 7
7	6.93 (d, 7.89, 1 H)	108.7	3a, 4, 5	6
7a	–	138.6	–	–
1'	3.32 (m, 2 H)	58.1	2', 3, N(CH ₃) ₂	2'
2'	3.18 (m, 2 H)	21.2	1', 2, 3, 3a	1'
N(CH ₃) ₂	2.82 (s, 6 H)	42.3	1', 2'	–

name isonorbaecystin. Methylation of **10** by PsiM in detectable amounts was not observed.

Therefore, we conclude that PsiM, the methyltransferase of the **2** pathway, cannot tolerate a 7-phosphoryloxy-substituted compound as acceptor substrate. This finding underscores the previously noted specificity of PsiM, which prevents *N,N*-dimethyltryptamine and **3** formation as intermediates in the **2** pathway.^[5]

Contrasting the use of the *trpB* gene in fungal genetics as a standard selection marker in 1-auxotrophic hosts, very few fungal tryptophan synthases were investigated biochemically.^[9a,13] *P. cubensis* TrpB is the first biochemically characterized tryptophan synthase of the basidiomycetes, which represent a phylum of more than 30 000 species. The intrinsic tolerance of TrpB to substituted indoles allowed for its integration into a biocatalytic process that produces **2** congeners, including **10** and **12**, and that translates into a facile and more cost-effective enzymatic synthesis of **2**. The value of the substrate **4**, used in the previous procedure, is approximately US\$180 mmol^{−1}, whereas the combined sales price for 1 mmol (each) of **6** and **7** as starting material in our refined process is about US\$2.

Directed in vitro evolution and structure-based engineering of genes encoding biosynthesis enzymes proved instrumental to optimize catalytic activity, introduce new activities, and relax

specificities, to create libraries of natural product derivatives.^[14] Thus, future work on enzyme engineering, in particular on the strictly specific methyltransferase PsiM, is warranted to access a larger structural diversity of **2** derivatives using only a small set of enzymes.

Experimental Section

Enzymatic reactions: All enzymatic in vitro reactions were carried out in triplicate. The enzyme concentration was 200 nM. In the case of multi-enzyme assays, each enzyme was present at this concentration. The reactions were stopped after the indicated incubation times by freezing and lyophilization. Subsequently, the residue was dissolved in methanol (MeOH), centrifuged for 10 min at 20000×g, and the supernatant was collected. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue dissolved in H₂O:acetonitrile (9:1, v/v), filtered, and used for chromatography (see below). The in vitro characterization of TrpB was performed in a volume of 100 µL and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 for 5 min at 30 °C (varied between 16–42 °C to determine the temperature optimum, and between pH 6.0 through 9.5 for the pH optimum). The substrates (**6**, and the respective indole substrate **5**, **7**, **8**, **9**, or **13**) were added at (each) 3 mM, the PLP concentration was 1 µM. Multi-enzyme reactions including TrpB, PsiD, PsiK, and PsiM were set up in a volume of 500 µL in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and proceeded for 4 h at 25 °C. The reactions yielding **2**, **10**, or **12** included **6** and indole substrates **7**, **8**, or **9** (3 mM final concentration each) as well as SAM, ATP, and MgCl₂ (6 mM each), the PLP concentration was 1 µM. Initially, all four enzymes were added. For subsequent assays yielding **12**, PsiK, PsiM, ATP, and SAM was omitted. The yield of **2** (20.7%) was determined by calculating the area under the curve of its chromatographic signal and compared to a standard curve, recorded with authentic compound.

Chemical analysis: LC-MS experiments were performed on an Agilent 1260 HPLC system equipped with a C₁₈ column (Zorbax Eclipse XDB, 150×4.6 mm, 5 µm) and coupled to a 6130 Single Quadrupole mass detector, high-resolution mass spectrometry was performed on a Thermo Accela liquid chromatograph, following described parameters.^[5] The 1D and 2D NMR spectra of **10** and **2** were recorded at 300 K on a Bruker Avance III spectrometer at 600 MHz for ¹H and at 150 MHz for ¹³C spectra. [D₂O]DMSO was used as solvent and internal standard. The solvent signals were referenced to $\delta_H = 2.50$ ppm and $\delta_C = 39.5$ ppm. Chemicals and solvents were purchased from Deutero, Key Organics, Sigma-Aldrich, Roth, TCI, and VWR. Alkaloids **2**, **11**, and **16** were purified from *P. cubensis* carpophores.

Detailed experimental procedures for microbiological and genetic methods, as well as for purification of enzymes and compound **10**, are described in the Supporting Information.

Acknowledgements

We thank A. Perner and H. Heinecke (Hans-Knöll-Institute Jena) for recording high-resolution mass and NMR spectra, respectively. F. Baldeweg acknowledges a doctoral fellowship by the Excellence Graduate School Jena School for Microbial Communication (JSMC). This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant HO2515/7-1). D.H.'s group is also

supported by the DFG Collaborative Research Center ChemBioSys 1127.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: alkaloid • biosynthesis • enzymes • psilocybin • tryptophan synthase

- [1] a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572; b) A. Y. Leung, A. H. Smith, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 1576–1579.
- [2] a) D. E. Nichols, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *101*, 131–181; b) F. Hasler, U. Grimberg, M. A. Benz, T. Huber, F. X. Vollenweider, *Psychopharmacology* **2004**, *172*, 145–156.
- [3] a) C. S. Grob, A. L. Danforth, G. S. Chopra, M. Hagerty, C. R. McKay, A. L. Halberstadt, G. R. Greer, *Arch. Gen. Psychiatry* **2011**, *68*, 71–78; b) M. W. Johnson, A. Garcia-Romeu, M. P. Cosimano, R. R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2014**, *28*, 983–992; c) A. Mahapatra, R. Gupta, *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **2017**, *7*, 54–56.
- [4] a) A. Hofmann, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Experientia* **1958**, *14*, 397–399; b) F. Troxler, F. Seemann, A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2073–2103; c) S. Ametamey, F. X. Vollenweider, J. Patt, D. Bourquin, F. Hasler, H.-F. Beer, P. A. Schubiger, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 585–594; d) F. Yamada, M. Tamura, M. Somei, *Heterocycles* **1998**, *49*, 451–457; e) H. Sakagami, K. Ogasawara, *Heterocycles* **1999**, *51*, 1131–1135; f) D. E. Nichols, S. Frescas, *Synthesis* **1999**, 935–938; g) O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 885–887; h) N. Gathergood, P. J. Scammells, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 921–923.
- [5] J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12352–12355; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524–12527.
- [6] a) E. W. Miles, H. Kawasaki, S. A. Ahmed, H. Morita, S. Nagata, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6280–6287; b) M. F. Dunn, D. Nicks, H. Ngo, T. R. Barends, I. Schlichting, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 254–264.
- [7] a) R. J. Goss, P. L. Newill, *Chem. Commun.* **2006**, 4924–4925; b) D. R. Smith, T. Willemse, D. S. Gkotsi, W. Schepens, B. U. Maes, S. Ballet, R. J. Goss, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2622–2625; c) D. Francis, M. Winn, J. Latham, M. F. Greaney, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 382–386; d) M. Herger, P. van Roye, D. K. Romney, S. Brinkmann-Chen, A. R. Buller, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8388–8391; e) A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen, D. K. Romney, M. Herger, J. Murciano-Calles, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14599–14604.
- [8] D. K. Romney, J. Murciano-Calles, J. E. Wehrmüller, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10769–10776.
- [9] a) W. H. Matchett, J. A. DeMoss, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 2941–2946; b) C. J. Bailey, P. D. Turner, *Biochem. J.* **1983**, *209*, 151–157.
- [10] a) C. Skrzynia, D. M. Binnering, J. A. Alspaugh, P. J. Pukkila, *Gene* **1989**, *81*, 73–82; b) S. E. Eckert, E. Kübler, B. Hoffmann, G. H. Braus, *Mol. Gen. Genet.* **2000**, *263*, 867–876.
- [11] M. Stanke, R. Steinkamp, S. Waack, B. Morgenstern, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W309–W312.
- [12] H. T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H. B. Korotkin, P. B. Matheny, J. C. Slot, *Evol. Lett.* **2018**, *2*, 88–101.
- [13] a) D. H. Wolf, M. Hoffmann, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *45*, 269–276.
- [14] a) C. A. Denard, H. Ren, H. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 55–64; b) G. Williams, R. W. Gantt, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 556–564.

Manuscript received: March 1, 2018

Revised manuscript received: April 27, 2018

Accepted manuscript online: May 11, 2018

Version of record online: June 19, 2018

CHEMISTRY

A **European** Journal

Supporting Information

Biocatalytic Production of Psilocybin and Derivatives in Tryptophan Synthase-Enhanced Reactions

Felix Blei, Florian Baldeweg, Janis Fricke, and Dirk Hoffmeister^{*[a]}

chem_201801047_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of Contents

Experimental procedures	3
Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with TrpB	4
Figure S2. Plots of initial velocities of TrpB.....	5
Figure S3. Size exclusion chromatography with TrpB	6
Figure S4. Key HMBC and ^1H , ^1H COSY correlations for isonorbaeocystin (10) and psilocybin (2).....	7
Figure S5. ^1H NMR spectrum of 10 in DMSO- d_6	8
Figure S6. ^1H decoupled ^{13}C NMR spectrum of 10 in DMSO- d_6	9
Figure S7. ^1H , ^1H COSY spectrum of 10 in DMSO- d_6	10
Figure S8. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of 10 in DMSO- d_6	11
Figure S9. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of 10 in DMSO- d_6	12
Figure S10. ^1H NMR spectrum of 2 in DMSO- d_6	13
Figure S11. ^1H decoupled ^{13}C NMR spectrum of 2 in DMSO- d_6	14
Figure S12. ^1H , ^1H COSY spectrum of 2 in DMSO- d_6	15
Figure S13. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of 2 in DMSO- d_6	16
Figure S14. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of 2 in DMSO- d_6	17
References.	18

Experimental Procedures

Microbiological methods and growth conditions. Undifferentiated mycelium of *Psilocybe cubensis* FSU12409 was grown at 25°C. For routine strain maintenance, solid malt extract peptone (MEP) medium was used (30 g L⁻¹ malt extract, 3 g L⁻¹ peptone, 18 g L⁻¹ agar, pH = 5.6). Fruiting bodies were grown as described previously.^[1] Media components were purchased from Roth and VWR.

Identification and cloning of the *trpB* gene. The *P. cubensis trpB* gene was identified by translating the genomic sequence *in silico* using the *Aspergillus nidulans* TrpB and *Coprinopsis cinereus* TRP1 sequences^[2] as queries using tblastn.^[3] TrpB gene models and intron/exon junctions were predicted using Augustus software.^[4] The *trpB* sequence has been deposited with GenBank under accession # MG923680. Searches for similar proteins were performed using blastp.^[5] Total *P. cubensis* RNA was isolated from carpophores using Promega's SV Total RNA Isolation System according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA synthesis was primed with oligo-d(T)-primers. The first strand reaction served as template in a subsequent PCR to amplify *trpB* full-length cDNA. The reaction (50 µL) included 0.2 mM of each dNTP, 2 mM MgSO₄, and 0.2 µM of primers oFB48 (5'-TATATAAGCTTCAATGGAGGCTATCAAAAAGGTT-3') and oFB49 (5'-TATATACTCGAGTTAGAATTTTGTGTGTGTCCAAC-3'), and 1 U of Phusion DNA polymerase (NEB) in HF buffer supplied with the enzyme. Thermal cycling was: initial hold at 98°C for 2 min, 35 cycles of 98°C for 15 s, 65°C for 20 s, and 72°C for 80 s, and a terminal hold at 72°C for 5 min. The PCR products of *trpB* were purified by gel electrophoresis, restricted with *Hind*III and *Xho*I, and ligated to the expression vector pET28a, restricted equally, to yield expression plasmid pFB14, which allows production of N-terminally hexahistidine-tagged TrpB protein. This plasmid was used to transform *E. coli* KRX (Promega).

Enzyme production and purification. PsiD, PsiK, and PsiM were produced as described.^[5] To produce TrpB, *E. coli* transformants carrying pFB14 were grown overnight in 5 mL LB-medium, selecting for kanamycin resistance (50 µg mL⁻¹). For enzyme production, a published procedure was followed.^[1] The four proteins were separately purified by metal affinity chromatography on Protino Ni²⁺-NTA resin (Macherey-Nagel). Pure proteins were desalted on PD-10 columns (GE Healthcare), equilibrated and eluted with Tris-HCl (50 mM, pH = 8.0). The purification was verified by polyacrylamide gel electrophoresis (12% Laemmli gel, Figure S1). Protein concentrations were determined by Bradford's assay.^[6] For size-exclusion chromatography, a GE Healthcare ÄktaPure 25 FPLC System was used that was equipped with a Superdex 200 increase 10/300 GL column (24 mL bed volume). Proteins were eluted in 10 mM phosphate buffer, pH = 7.4, with 140 mM NaCl at a flow of 0.5 mL min⁻¹. For calibration, the high molecular weight standard (GE Healthcare) was used. To determine kinetics, the L-serine concentration of was varied between 0.5 and 4 mM, the indole concentration was varied between 30 and 900 µM, 4-hydroxyindole was varied between 30 and 60 µM. The triplicated reactions were stopped after 20, 40, 60, 80, and 100 sec. by freezing the sample in liquid nitrogen. Other reaction conditions were as described in the experimental section of the main text.

Production and purification of isonorbaecystin (10):

The scaled-up one pot **10** product formation assays were performed with *Psilocybe cubensis* enzymes TrpB, PsiD, and PsiK, buffered in 50 mM Tris-HCl, pH = 8.0, in a volume of 10 mL. L-serine and 7-hydroxyindole were added at 2 mM, ATP and MgCl₂ at 6 mM, and PLP at 1 μM final concentration. Incubation was for 4 h or overnight at 25°C. The water was evaporated under reduced pressure, the residue was dissolved in methanol, centrifuged, and the supernatant collected. The solvent was removed in a rotary evaporator, and the residue was brought up in acetonitrile (ACN):0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (9:1, v/v).

Pure **10** was obtained by semipreparative HPLC on an Agilent 1260 instrument that was equipped with a Zorbax Eclipse XDB C-18 column (9.4 × 250 mm, 5 μm). A linear gradient (0.1% TFA in water/ACN) was run that increased from 10 to 23% acetonitrile within 10 min, at a flow of 2 ml min⁻¹. Remaining intermediate **14** was collected during the same chromatographic runs and converted into **10** in subsequent reactions with PsiD and PsiK under the above conditions. Final purification was accomplished by chromatography on the same instrument using a ThermoFisher Hypercarb column (4.6 × 150 mm, 5 μm) with a linear water/acetonitrile gradient (1 ml min⁻¹), increasing from 20 to 27% ACN within 12 min. The fractions containing **10** were pooled, the solvent was removed under reduced pressure and the sample was lyophilized.

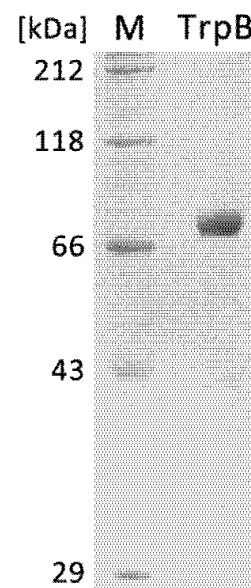


Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with recombinantly produced *Psilocybe cubensis* tryptophan synthase TrpB. M: Molecular weight marker with indicated sizes.

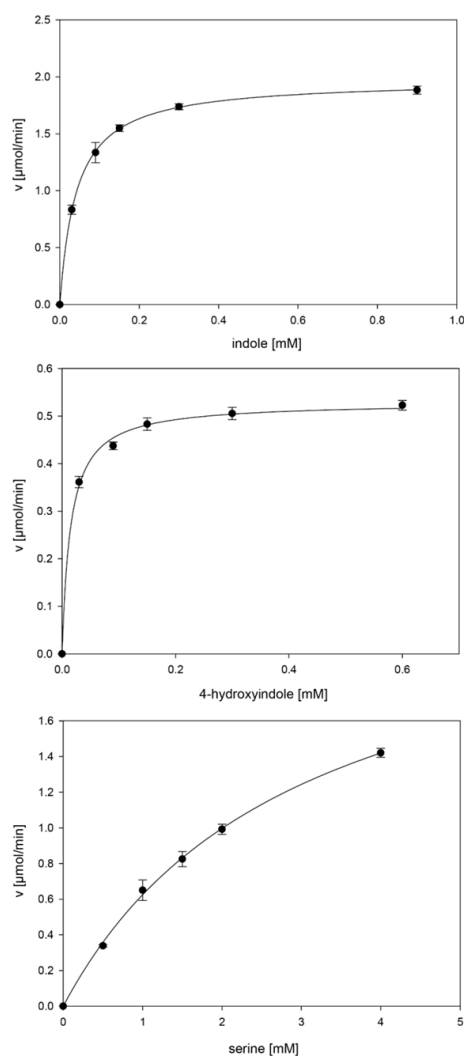


Figure S2. Plots of initial velocities of *Psilocybe cubensis* tryptophan synthase TrpB for indole, 4-hydroxyindole, and L-serine.

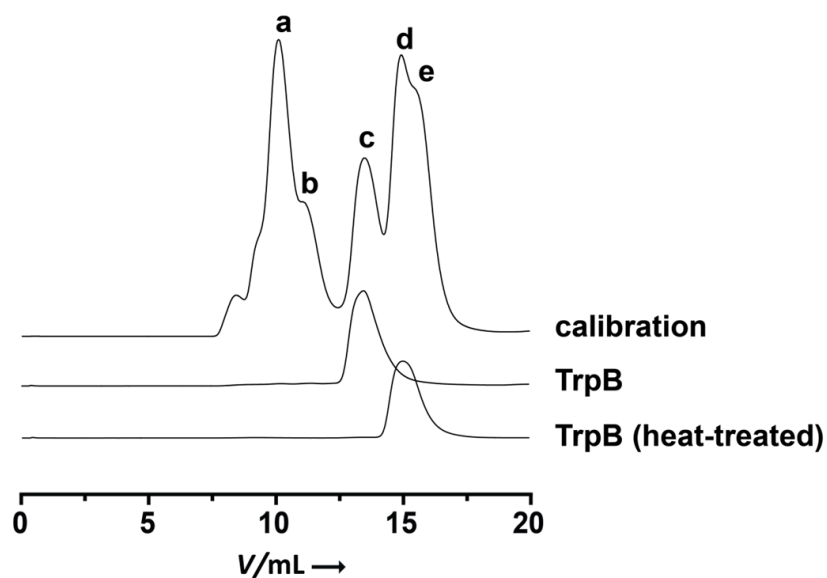


Figure S3. Size exclusion chromatography with native and heat-treated tryptophan synthase TrpB. Proteins were loaded onto a Superdex 200 column and eluted using 10 mM phosphate buffer with 140 mM NaCl. Heat-treated TrpB enzyme eluted at 14.7 mL (corresponding to ca. 77 kDa), whereas the untreated active enzyme already appeared at 13.4 mL, corresponding to ca. 155 kDa, i.e., the mass of dimeric TrpB. The calculated mass of monomeric *N*-terminally His-tagged TrpB is 77.6 kDa. The calibration track includes the following signals: a) 669 kDa (thyroglobulin), b) 440 kDa (ferritin), c) 158 kDa (aldolase), d) 75 kDa (conalbumin), e) 43 kDa (ovalbumin).

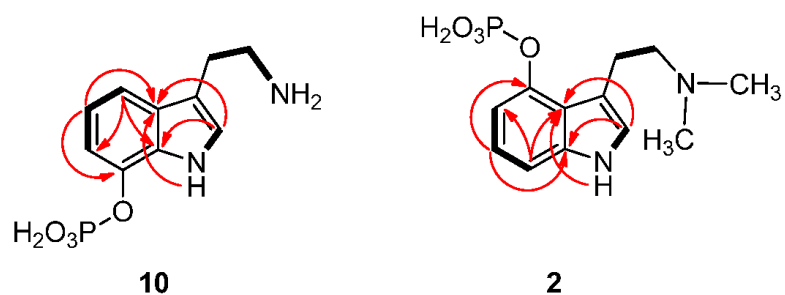


Figure S4. 2D NMR analyses that determine the position of the phosphoryloxy group in isonorbacocystin (**10**). For comparison, correlations for psilocybin (**2**) are indicated. Key HMBC correlations (red arrows) and $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY correlations (bold) are shown.

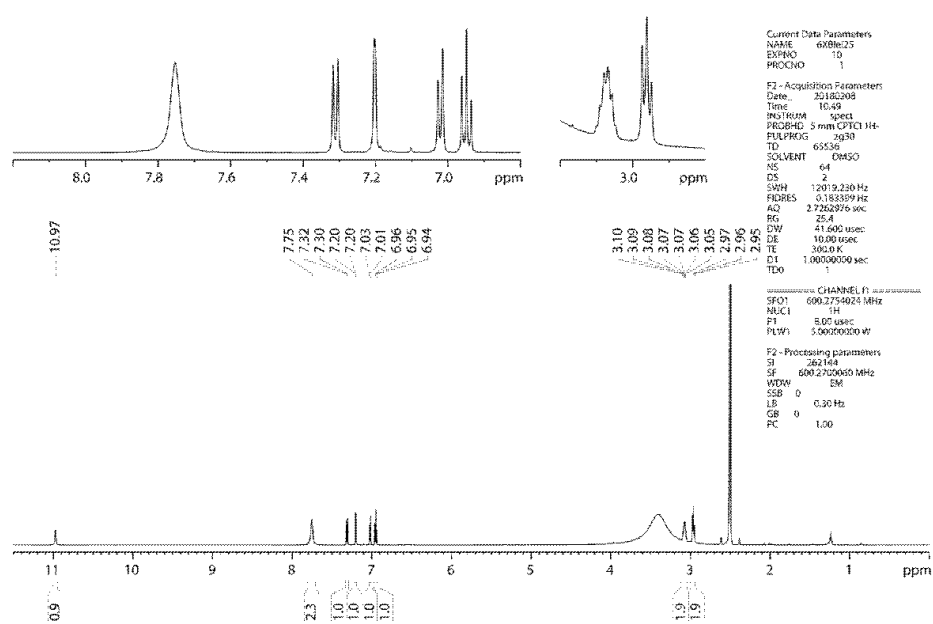


Figure S5. ^1H NMR spectrum of **10** in $\text{DMSO}-d_6$

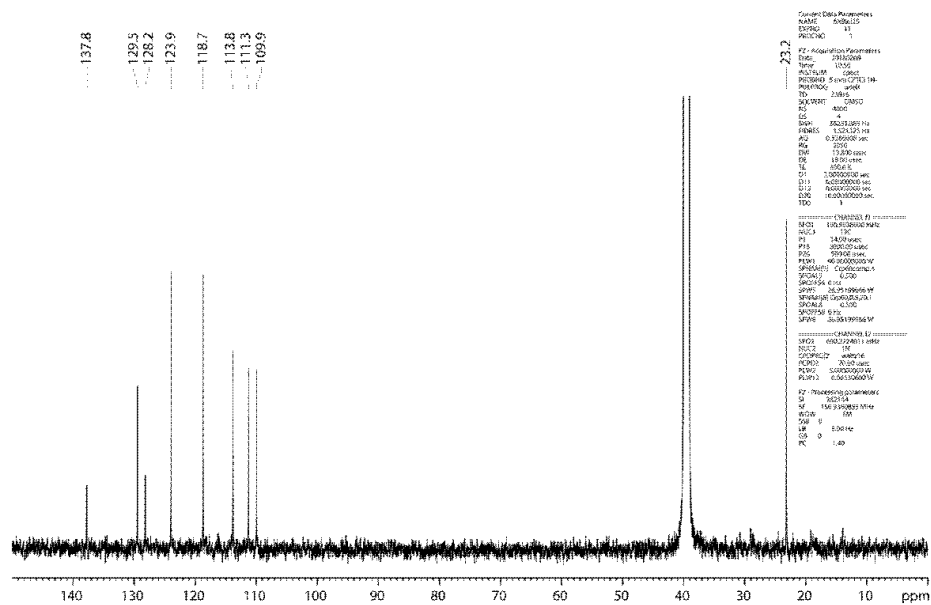


Figure S6. ^1H decoupled ^{13}C NMR spectrum of 10 in $\text{DMSO}-d_6$

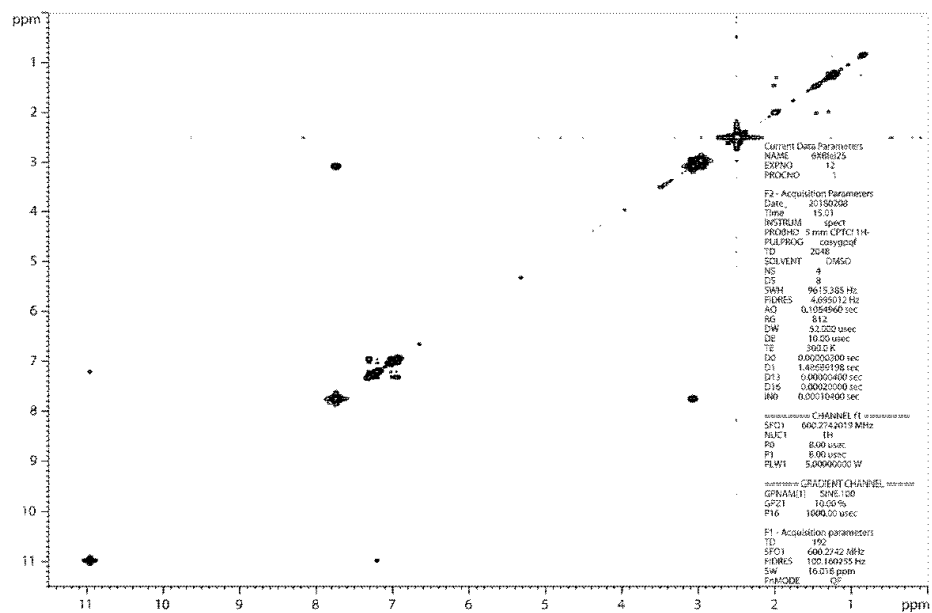


Figure S7. ^1H , ^1H COSY spectrum of **10** in $\text{DMSO}-d_6$

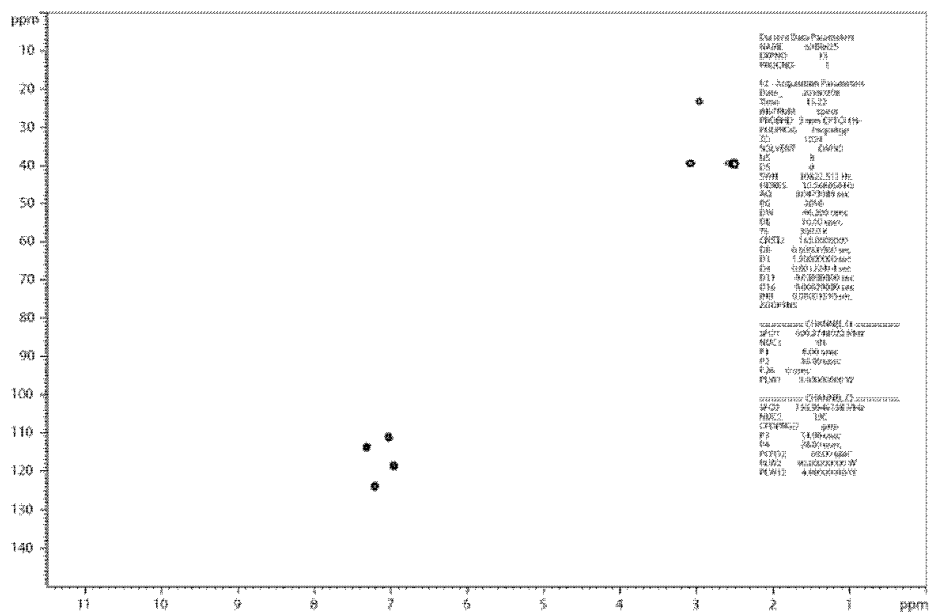


Figure S8. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of **10** in $\text{DMSO}-d_6$

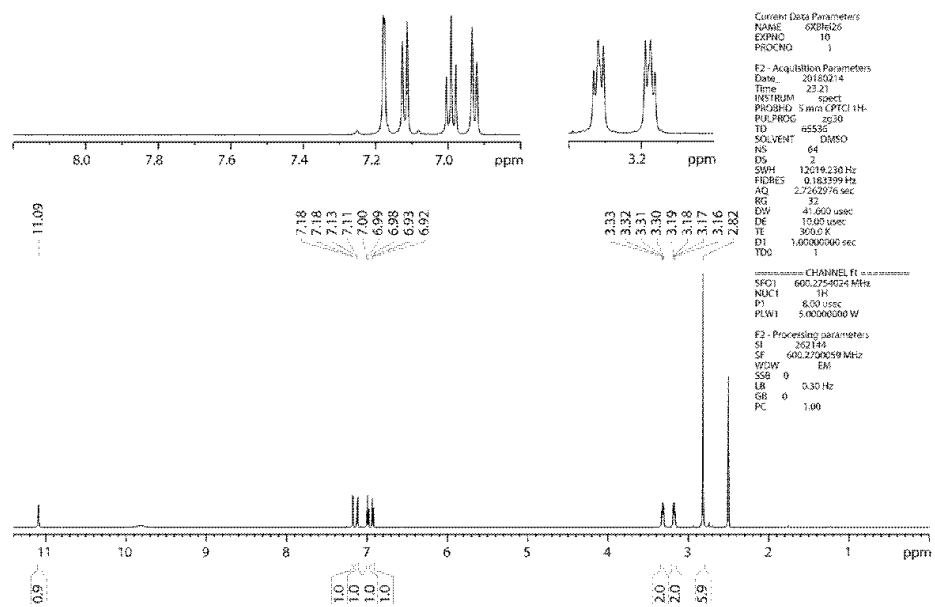


Figure S10. ^1H NMR spectrum of **2** in $\text{DMSO}-d_6$

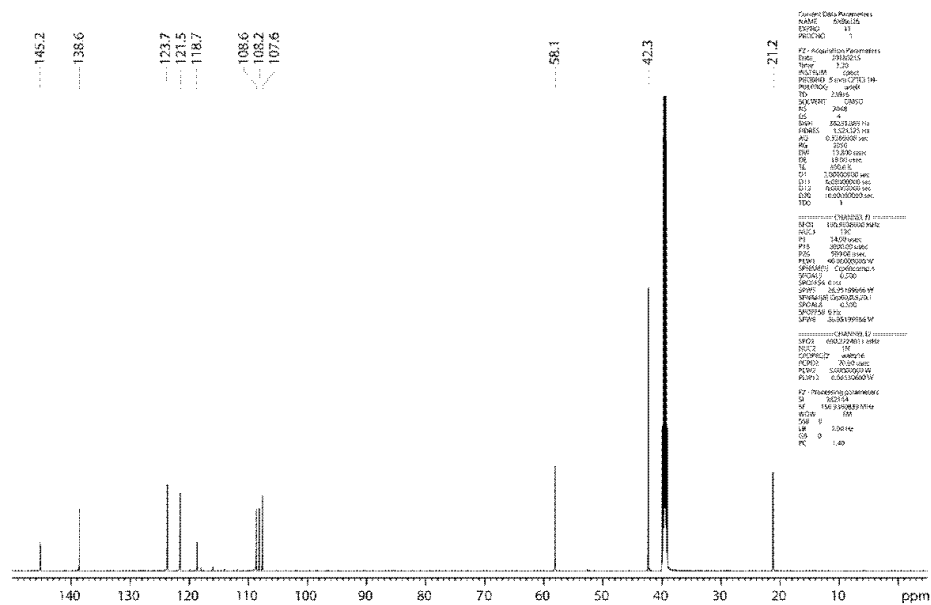


Figure S11. ^1H decoupled ^{13}C NMR spectrum of **2** in $\text{DMSO}-d_6$

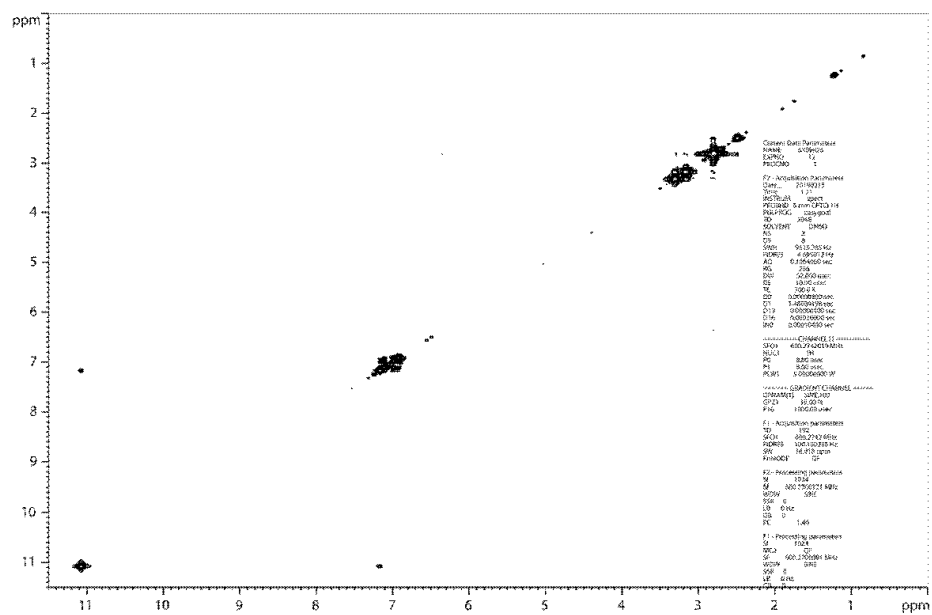


Figure S12. ^1H , ^1H COSY spectrum of **2** in $\text{DMSO-}d_6$

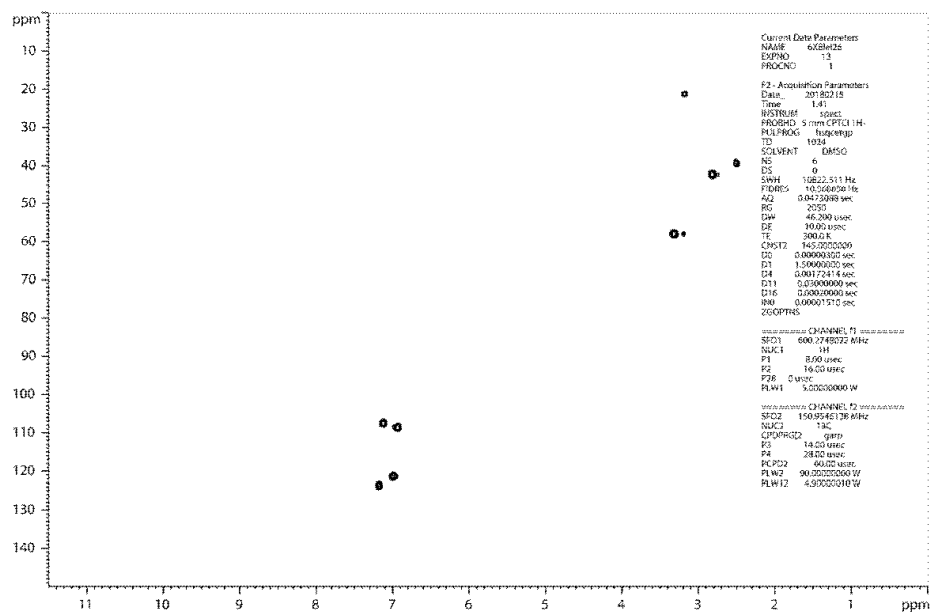
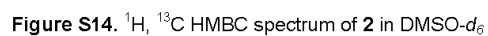


Figure S13. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of **2** in $\text{DMSO}-d_6$



References

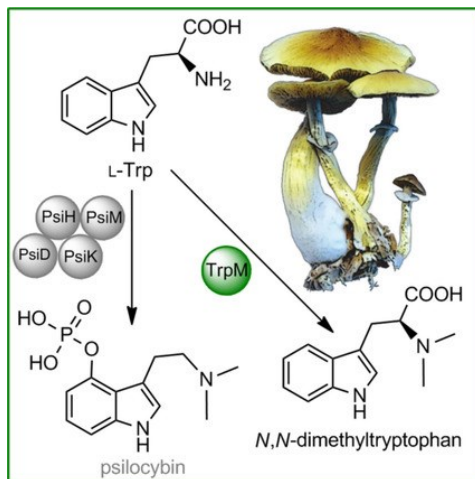
- [1] C. Lenz, J. Wick, D. Hoffmeister, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2835-2838.
- [2] (a) C. Skrzynia, D.M. Binninger, J.A. Alspaugh, P.J. Pukkila, *Gene* **1989**, *81*, 73-82; (b) S.E. Eckert, E. Kübler, B. Hoffmann, G.H. Braus, *Mol. Gen. Genet.* **2000**, *263*, 867-876.
- [3] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.
- [4] M. Stanke, R. Steinkamp, S. Waack, B. Morgenstern, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W309-312.
- [5] J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Intl. Ed.* **2017**, *56*, 12352-12355.
- [6] M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

3.3 Iterative L-tryptophan methylation in *Psilocybe* evolved by subdomain duplication

Felix Blei, Janis Fricke, Jonas Wick, Jason C. Slot, Dirk Hoffmeister

Chembiochem, Band 19, Ausgabe 20, Seiten 2160-2166, 2018

Zusammenfassung



Aus dem Pilz *P. serbica* konnte eine zweite L-Tryptophan Methyltransferase (TrpM) charakterisiert werden, welche eine Psilocybin-unabhängige Biosynthese des *N,N*-Dimethyltryptophans katalysiert. Es zeigte sich eine strikte Substratspezifität und 4-Hydroxy-Tryptophan und -Tryptamin wurden nicht als Substrate akzeptiert, welches eine Überschneidung mit der Psilocybin-Biosynthese ausschließt. Unter Verwendung einer Adenin-Desaminase und S-

Adenosylhomocysteine-Nukleosidase konnte durch Aufhebung einer Produkthemmung die Entstehung des dreifach methylierten Alkaloides L-Hyphaphorin gezeigt werden. Weiterhin zeigten phylogenetische Untersuchungen von *trpM* mit anderen MT den Ursprung in einer teilweisen Verdopplung von *egtDB*, einem stark konservierten Gen der Ergothioneine-Biosynthese. Hinter diesem Mechanismus wird ein neuer genereller Evolutionsmechanismus vermutet. Dieser beruht auf einer Genduplikation stark konservierter Biosynthesen, dessen Kopien keinerlei Selektionsdruck unterliegen und so leicht evolvieren.

Angaben zum Eigenanteil: 45 %

Herstellung Plasmide und Heterologe Genexpression, Herstellung rekombinanter Proteine und Durchführung aller Reaktionen, Charakterisierung von TrpM, Analyse der Proben per HPLC, Mitarbeit am Manuskript

Jena, den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

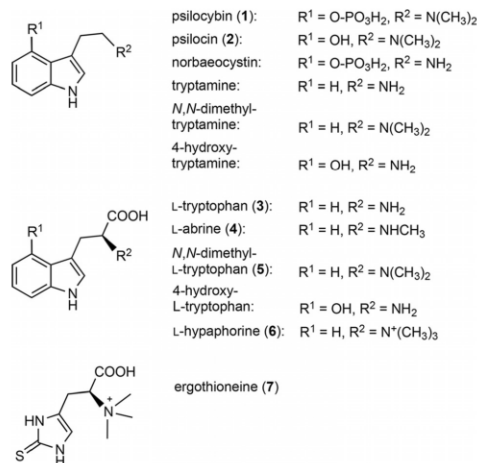
Iterative L-Tryptophan Methylation in *Psilocybe* Evolved by Subdomain Duplication

Felix Blei,^[a] Janis Fricke,^[a] Jonas Wick,^[a] Jason C. Slot,^{*,[b]} and Dirk Hoffmeister^{*,[a]}

Psilocybe mushrooms are best known for their L-tryptophan-derived psychotropic alkaloid psilocybin. Dimethylation of norbaeocystin, the precursor of psilocybin, by the enzyme PsiM is a critical step during the biosynthesis of psilocybin. However, the “magic” mushroom *Psilocybe serbica* also mono- and dimethylates L-tryptophan, which is incompatible with the specificity of PsiM. Here, a second methyltransferase, TrpM, was identified and functionally characterized. Mono- and dimethylation activity on L-tryptophan was reconstituted in vitro, whereas tryptamine was rejected as a substrate. Therefore, we describe a second L-tryptophan-dependent pathway in *Psilocybe* that is not part of the biosynthesis of psilocybin. TrpM is unrelated to PsiM but originates from a retained ancient duplication event of a portion of the *egtDB* gene that encodes an ergothioneine biosynthesis enzyme. During mushroom evolution, this duplicated gene was widely lost but re-evolved sporadically and independently in various genera. We propose a new secondary metabolism evolvability mechanism, in which weakly selected genes are retained through preservation in a widely distributed, conserved pathway.

The fungal genus *Psilocybe* comprises numerous mushroom species that biosynthesize tryptamine alkaloids, primarily psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine, **1**, Scheme 1).^[1] It represents a prodrug to its dephosphorylated congener psilocin (**2**), which agonistically targets serotonin receptors in the central nervous system.^[2] The colloquial term “magic mushrooms” for these fungi alludes to their psychotropic effects and to their use as recreational drug. However, clinical trials have recognized **1** as a valuable candidate to be developed into a medication against cancer-related anxiety and treatment-resistant depression.^[3]

Relying on *Psilocybe cubensis*, *Psilocybe cyanescens*, and other species, the evolutionary, ecological, and biochemical aspects of the biosynthesis of **1** have been investigated in our laboratories.^[4] Evolutionarily, the production of **1** might be advantageous to alter the behavior of mycophagous and wood-inhabiting insects that share their habitat with the fungus. For



Scheme 1. Structures of indole alkaloids isolated from *Psilocybe* and other fungal species, of the products of the methyltransferase TrpM, and of ergothioneine.

its biosynthesis, L-tryptophan (**3**) is fed into a sequential four-step pathway, catalyzed by the decarboxylase PsiD, the P₄₅₀ monooxygenase PsiH, the kinase PsiK, and the *N*-methyltransferase PsiM (Scheme 2). Importantly, the preference of PsiM for norbaeocystin (Scheme 1), that is, a substrate with a 4-phosphoryloxy group, places this enzyme at the end of the biosynthetic cascade of **1**.^[4a,c] However, during mass spectrometric analyses of *Psilocybe serbica* extracts, we surprisingly found signals that were consistent with the masses of L-tryptophan (**3**), L-tryptamine (**4**) and *N,N*-α-dimethyl-L-tryptophan (**5**; Figure 1), which are known natural products, for example, from the jequirity bean (*Abrus precatorius*).^[5] As PsiM does not accept **3** as a substrate, the occurrence of **4** and **5** in *P. serbica* is indicative of PsiM-independent methylation by an as-yet-unknown enzyme.

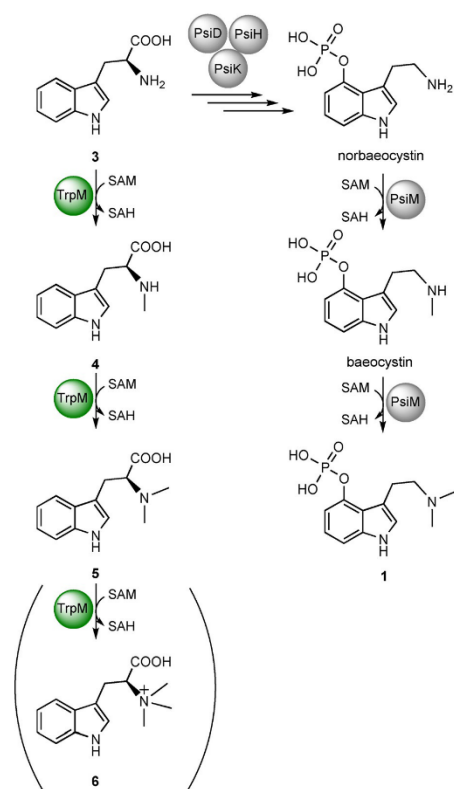
We here report on the functional and phylogenetic characterization of TrpM, an *S*-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methyltransferase of *P. serbica*. This enzyme does not take part in the biosynthesis of **1** but catalyzes a second pathway that originates from **3** and includes the formation of a tertiary amine by iterative *N*-methylation.

PsiM-independent methylation of **3** in *Psilocybe* mushrooms appeared plausible, given the report on EgtD, a mycobacterial enzyme that features a MT_33 methyltransferase superfamily domain. EgtD is required for the biosynthesis of ergothioneine (**7**) and processively trimethylates L-histidine.^[6] Compound **7**

[a] F. Blei, J. Fricke, J. Wick, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department of Pharmaceutical Microbiology at the Hans Knöll Institute
Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

[b] Prof. J. C. Slot
Department of Plant Pathology, Ohio State University
2021 Coffey Road, Columbus, OH 43210 (USA)
E-mail: slot.1@osu.edu

Supporting Information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/cbic.201800336>.



Scheme 2. Methyl-transfer steps during the biosynthetic pathways to 5 and 1 in *P. serbica*. The parentheses and the dashed arrow indicate low turnover to 6 by TrpM.

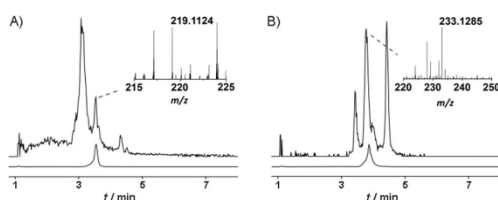


Figure 1. Mass spectrometric analysis of *P. serbica* mycelial extracts. A) Extracted ion chromatogram for m/z 219–220. At $t_R = 3.6$ min, the mass of monomethylated 3, for example, L-abrine (4, m/z calcd 219.1129 [$M+H$] $^+$; found 219.1124) was detected. B) Extracted ion chromatogram for m/z 233–234. Only the signal at $t_R = 3.9$ min (m/z 233.1285 [$M+H$] $^+$) is consistent with the exact mass of dimethylated 3, for example, *N,N*- α -dimethyl-L-tryptophan (5, m/z calcd 233.1284 [$M+H$] $^+$). Ion chromatograms of standards 4 and 5 are shown below the sample traces.

occurs in various fungi (and bacteria and plants alike) and is hypothesized to participate in cellular redox processes.^[6a] Specifically, crystallographic work and subsequent targeted active-

site engineering of EgtD (EgtD_{E282A,M252V}) to emulate a fungal active site converted this enzyme into a 3 methyltransferase. Combined with surveys on fungal genomic data, this finding suggested that mushrooms use EgtD-like methyltransferases to produce L-hypaphorine (*N,N,N*- α -trimethyl-L-tryptophan, 6, Scheme 1).^[6a] This fungal product is ecologically relevant as an agonist of the phytohormone indole-3-acetic acid, which is, for example, secreted by the tree partner in ectomycorrhizal symbioses.^[7]

The genomic sequence of a North American *P. cyanescens* isolate is published, as is that of a Central European isolate of *P. serbica* (which falls into *P. cyanescens* species complex in the wide sense).^[4] This sequence data was browsed for other genes encoding small-molecule methyltransferases. In the European isolate (*P. serbica* FSU12416), two *egtD*-like genes were identified. One was fused to an *egtB* homologue, which is the expected gene for the sulfoxide synthase required for the putative assembly of 7. Fused *egtDB* genes for the biosynthesis of 7 are common in fungi. The second gene encoded a nonfusion methyltransferase that we considered a candidate enzyme for the methylation of 3. Standalone *egtD*-like genes rarely exist in basidiomycetes. Examples include HyoA,^[6a] a putative 6 synthase of the mushroom *Dichomitus squalens* that shares 37% identical amino acids, and a hypothetical protein of *Galerina marginata* (protein ID: KDR66884.1, 70% identity).

In *P. serbica* FSU12416, the 1237 bp candidate gene *trpM* is disrupted by three introns, as predicted by Augustus software. The 1077 bp reading frame thus encodes a 358 aa protein with a calculated isoelectric point (pI) of 5.1 and a mass of 39.6 kDa. Notably, *trpM* is not encoded within the biosynthesis gene cluster of 1. Also, TrpM and PsiM are phylogenetically unrelated, as the former is a member of the methyltransferase family 33, whereas the latter belongs to family 10. The *trpM* cDNA was sequenced to confirm the predicted introns, whereas a synthetic codon-optimized gene was used to create expression plasmid pFB06. N-Terminally tagged hexahistidine TrpM fusion protein was produced in *Escherichia coli* KRX and was purified by immobilized metal chelate affinity chromatography (Figure S1 in the Supporting Information).

Gel-permeation chromatography confirmed that TrpM was a monomer under native conditions (Figure S2), consistent with previous findings by Seebeck and colleagues on EgtD.^[8] Subsequently, TrpM was tested for activity in vitro. Hypothesizing that it catalyzes the methylation of 3, we first used this substrate to test the activity of the recombinantly produced enzyme. Assays were run in Tris buffer (pH 8.0) for 15 min. For a time course of the reaction, samples were taken in 30 s intervals over 150 s and were subsequently analyzed by LC-MS (Figures 2 and S3). The analysis showed simultaneous formation of mono- and dimethylated 3 across this time course. One product was identical to an authentic standard of 4 regarding its retention time ($t_R = 16.6$ min, Figure 2), UV/Vis spectrum, and molecular mass (m/z 219.1134 [$M+H$] $^+$; calcd m/z 219.1129 [$M+H$] $^+$). The identity of the expected second product (i.e., 5, $t_R = 15.6$ min) was confirmed by 1H NMR spectroscopy after purification (Figure S4). The Michaelis constants (K_m) for 3 and 4 were 3.7 and 1.0 μM , respectively, as determined with a lumi-

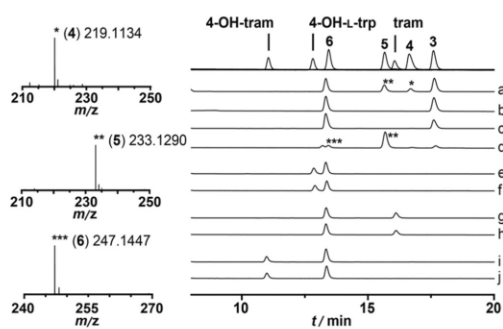


Figure 2. LC-MS analyses of TrpM *in vitro* activity tests. HRMS (ESI) spectra were recorded in the positive mode. Experimentally determined masses are indicated. Top trace: overlaid separate chromatograms of standard compounds. Trace a: TrpM reaction with **3**. Trace b: TrpM reaction with *D*-tryptophan. Trace c: control with heat-treated TrpM. Trace d: prolonged TrpM reaction with **3** in the presence of SAH nucleosidase and adenine deaminase. Traces e and f: TrpM reaction with 4-hydroxy-L-tryptophan and negative control, respectively. Traces g and h: TrpM reaction with tryptamine and negative control, respectively. Traces i and j: TrpM reaction with 4'-hydroxy-tryptamine and negative control, respectively. The signal at $t_R = 12.9$ min corresponds to m/z 298.0974 $[M+H]^+$, which is compatible with the mass of 5'-methylthioadenosine, a breakdown product of SAM. Tram = tryptamine, trp = tryptophan.

nescence assay. The turnover numbers (k_{cat}) were 3×10^{-2} and $2.9 \times 10^{-2} s^{-1}$. Low K_m and k_{cat} values are well documented for other small-molecule methyltransferases, for example, EgtD and EgtD^{E282A,M252V} [6a-c] and the C-methyltransferase TylC3 for the biosynthesis of L-mycarose.^[9] The k_{cat} values for the first and second TrpM-catalyzed methylations virtually do not diverge, which points to increased affinity of TrpM to the mono-methylated intermediate, as indicated by the respective K_m values; this is also consistent with findings for EgtD.

Under standard conditions, the formation of **6** was not observed. In separate assays, S-adenosylhomocysteine (SAH) nucleosidase and adenine deaminase were added to remove SAH irreversibly from the reaction. After prolonged incubation for 4 h, **6** was detectable as a minor product ($t_R = 13.3$ min), besides **4** and **5** (Figure 2). 4-Hydroxy-L-tryptophan and *D*-tryptophan did not serve as substrates (Figure 2).

Psilocybe mushrooms control the PsiM-catalyzed methyl-transfer steps during the biosynthesis of **1** by requiring substrates that have a 4-phosphoryloxy group. Consequently, tryptamine is not accepted. This important property minimizes, or prevents altogether, the formation of reactive and unstable **2**. Otherwise, **2** could be formed from *N,N*-dimethyltryptamine, which may undergo subsequent 4-hydroxylation by the rather unspecific monooxygenase PsiH. Here, we tested whether tryptamine was a substrate for TrpM. Under the applied conditions, turnover was not observed by chromatographic analysis, and not even trace amounts of *N,N*-dimethyltryptamine or its *N*-monomethyl precursor were detected by mass spectrometry (Figure 2, traces g and h). 4-Hydroxytryptamine was also not turned over. An important feature of the biosynthesis of **1** is that the formation of **2** is avoided. TrpM does not participate

in the biosynthesis of **1**, but its substrate specificity also prevents the formation of **2**, as the products of TrpM, **4**, **5**, and **6**, are not intermediates or shunt products of the biosynthetic pathway of **1**. The biosynthesis of both **1** and **5** originates from **3** (Scheme 2). However, cellular localization of the respective enzymes or mutually exclusive gene expression, for example, dependent on the developmental stage, may prevent competition for **3** as a principal building block.

Given the activity of EgtD,^[6] we next tested if L-histidine was also converted by TrpM *in vitro*. ESI-MS analysis revealed mono- and dimethylation, whereas trimethylation was not found. L-Tyrosine and L-phenylalanine were also mono- and dimethylated *in vitro* (Figure S5). In mycelial extracts of *P. serbica*, mono- and dimethylated L-phenylalanine was identified by LC-MS (Figure S6), whereas not even trace amounts of the methyl derivatives of L-histidine and L-tyrosine were detected.

Seebeck et al. characterized the mycobacterial wild-type EgtD (which is specific for L-histidine), the engineered variant EgtD^{E282A,M252V} (specific for **3**), and Ybs, an *Aspergillus* methyltransferase specific for L-tyrosine.^[6] Our *in vitro* results indicate that TrpM is more flexible for acceptor substrates than the above methyltransferases. Yet, our data also support the notion that wild-type EgtD is outstanding, in that it efficiently trimethylates, whereas EgtD^{E282A,M252V} and TrpM virtually stop at the dimethyl stage. Of note, the residues of EgtD known to interact with the (methylated) α -amino group of L-histidine, that is, Gly161 and Asn166, are conserved in TrpM (Gly192 and Asn197). Asn166 in EgtD is essential to make *N,N*-dimethyl-L-histidine a 100-fold stronger ligand than L-histidine.^[6b] Crystallographic work would be warranted to elucidate the respective roles of the active-site residues for TrpM.

PsiM and TrpM share a functional relationship. Therefore, we hypothesized that the evolution of their respective pathways was correlated. To address this question and to understand the evolutionary relationship between EgtD and the metabolism of **7** in fungi, we conducted a phylogenetic analysis of homologues of TrpM-coding genes in Agaricomycetes. A maximum likelihood tree places *trpM* in a clade with 12 orthologues from diverse Agaricomycete species that is nested in a larger group of enzymes from a larger diversity of Agaricomycetes (Figures 3A and S7). Homologues of *trpM* in this phylogeny are variable in structure; whereas all orthologues of *trpM* code for a single MT_33/EasF (EgtD) domain, the rest of the tree is mainly composed of EgtDB bifunctional proteins, with a C-terminally linked YfmG superfamily sulfoxide synthase (EgtB) domain. On the basis of the topological congruence between the *trpM* clade and its mostly EgtDB sister clade (Figure 3A), which includes the *trpM* taxa, we infer that *trpM* originated by partial duplication of *egtDB* at an intermediate stage of the diversification of Agaricomycetes. The phylogeny also reveals at least ten recent (mostly species-specific) duplications that result in taxonomically diverse EgtD proteins. Since its origin by an ancient duplication, *trpM* has been periodically lost and is no longer present in most Agaricomycetes, and it is the only long-retained duplication in the phylogeny, which suggests EgtD-only paralogues have been unstable during the diversification of Agaricomycetes. This instability is exemplified by the recent

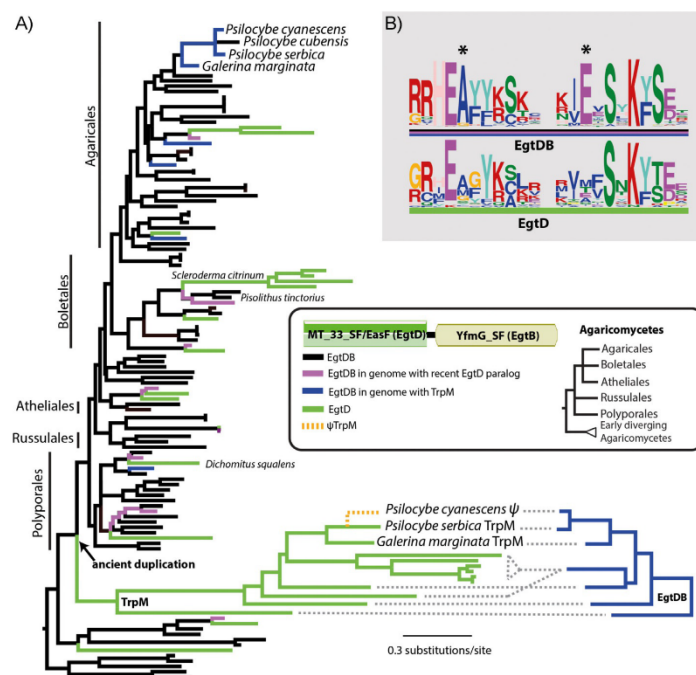


Figure 3. Evolutionary origin of TrpM and related enzymes. TrpM originated by partial duplication of a putative ergothioneine (7) bifunctional enzyme (EgtDB). A) Maximum likelihood phylogeny of MT_33 superfamily domains extracted from nearest PsIM homologues in Agaricomycetes (phylogeny with accession numbers in Figure S7 A). EgtD enzymes (green branches) emerged once anciently (TrpM) and at least ten times recently by partial duplication of a bifunctional putative enzyme, EgtDB, for the synthesis of 7. There are few TrpM monofunctional proteins surviving since the ancient duplication in Agaricomycetes, and they are lost in *P. cubensis* and pseudogenized in *P. cyanescens*. The *P. cyanescens* pseudogene (ψ) is shown for illustration but was not included in the phylogenetic analysis. A reversed phylogeny of EgtDB enzymes from genomes containing TrpM (see also Figure S7 B) demonstrates topological congruence between the alternate paralogues. Species phylogeny in the key follows Hibbett et al.¹⁰ B) Motifs associated with specificity-determining residues (*) 252 (left) and 282 (right) of Agaricomycetes EgtD domains/proteins. Position number is relative to *M. smegmatis* EgtD (A0R5M8.1).

loss of EgtD in *P. cubensis* and in the pseudogenization in *P. cyanescens*, in which it is truncated and contains an in-frame stop codon (Figure S8).

The functions of convergently evolved EgtD are only partly understood in fungi. The only other functionally characterized enzyme in the phylogeny (Figure 3 A) is the *D. squalens* EgtD previously predicted to produce 6,^[6a] which is the product of a recent partial duplication of EgtDB. *Pisolithus tinctorius* *egtD* genes, which might also be involved in the production of 6, are distantly related homologues and were analyzed separately (Figure S9 A), whereas genes for EgtDB from *P. tinctorius* and other Boletales are present, along with four recent *egtD* paralogues from *Scleroderma citrinum*. The gene for EasF is another distant *egtD* homologue in the *Claviceps purpurea* (ergot fungus, Ascomycota) ergotamine biosynthesis cluster that is more similar to Ascomycota *egtDB* sequences than to the *egtDB* sequences presented here (Figure S9 B).

The phylogenetic distribution of gene families indicates ecological functions.^[11] EgtD, by producing 6, is important for the formation of mycorrhizae in *P. tinctorius*,^[7a] which has four

paralogues of a very distantly related *egtD*, all of which are co-orthologous with just one EgtD encoded in *S. citrinum* (Figure S9 A). If the parallel recent expansion of *egtD* in *S. citrinum* (Figure 3 A) represents convergent ectomycorrhiza-related metabolism, this is in contrast to the broader distribution of *egtD* homologues. The majority of Agaricomycetes with orthologues of *trpM* and/or the recent *egtD* paralogues shown here are involved in lignocellulose decay, often of exposed substrates, which suggests their products are involved in competition with invertebrates or bacteria. It is also interesting to note that EgtD in the Saprolegniales (oomycetes) appears to have originated by partial horizontal transfer of an EgtDB from aquatic true fungi (Figure S9 C).

The evolutionary instability of EgtD is consistent with a transition from a broadly selected function in the biosynthesis of 7^[12] to one in secondary metabolism, which tends to be conditionally retained through diversifying ecological selection. In keeping with functional diversification of EgtD in Agaricomycetes, the substrate-specificity-determining amino acid position 282 (relative to *Mycobacterium smegmatis*) is highly con-

served as glutamic acid for histidine binding in 97 EgtDB sequences but is variable as mainly Met, Thr, Glu, Ala, and Ser in 25 EgtD sequences (Figure 3B). Similarly, position 252 is highly conserved as alanine in EgtDB but is variable as mainly Ala, Met, Gly, and Ser in EgtD. It is also plausible that fitness costs to the organism account in part for the instability of recently evolved EgtD by detrimentally interfering with the synthesis of **7** owing to the irreversibility of histidine N-methylation; this hypothesis should ultimately be tested in a genetically tractable model fungus.

Gene duplication has long been identified as a source of genetic novelty^[13] and has strongly influenced the metabolic diversity of fungi through the sub- and neofunctionalization of paralogues.^[14] Further, gene fissions are important sources of novel functions in fungi and oomycetes.^[15] We have characterized the function of TrpM, a methyltransferase generated by duplication of the first domain of a presumed bifunctional enzyme, EgtDB, necessary for the synthesis of **7**. We further demonstrated several convergent origins of EgtD in Agaricomycetes by the same mechanism. Filamentous Ascomycota maintain their EgtD enzymes encoded in diverse secondary metabolism gene clusters, which can be specialized and retained in large pan-genomes and acquired by horizontal gene transfer (HGT).^[16] However, our data indicate that Basidiomycota benefit more from de novo neo-functionalization of vertically inherited enzymes because of lower rates of clustering and HGT.

Our results highlight a secondary metabolism evolvability mechanism, in which weakly or sporadically selected functions remain accessible through their preservation in a widely distributed, structurally conserved bifunctional protein. Selection on within-protein interactions and broadly conserved functions possibly maintain these domains as a source of secondary metabolic diversity, but these domains are otherwise lost in transiently adaptive roles. In short, genes for these highly conserved bifunctional proteins may function as genetic templates from which less-conserved functions can repeatedly evolve. Traditionally, the fungal genus *Psilocybe* impacted natural products chemistry owing to its capacity to biosynthesize **1**. Our results demonstrate that the relevance of this genus reaches further, and they also help to address more fundamental aspects of the evolution of fungal small-molecule-processing enzymes.

Experimental Section

General and microbiological procedures: *P. serbica* FSU12416 was grown at 25 °C in the dark on malt extract peptone (MEP) agar plates or in MEP liquid medium shaken at 140 rpm for 20 days at room temperature. Plasmid isolation, DNA restriction, and ligation were performed by following the instructions of the manufacturers of the kits and enzymes (NEB, Promega, Thermo, Zymo). Chemicals, media ingredients, and solvents were purchased from Roth, Sigma-Aldrich, VWR, and Deutero.

Cloning of *trpM* cDNA and construction of expression plasmid: mRNA was isolated from *P. serbica* mycelium by using Promega's SV Total RNA isolation kit. First strand cDNA synthesis was primed with oligo-d(T) primers and RevertAid reverse transcriptase. The

first strand reaction served as a template in a subsequent PCR with the primers (0.2 μM each) ofFB51 (5'-ATGCC GCGAA TCCAG GTT-3') and ofFB52 (5'-TTAGC TTCGT CCGGT TACTT CG-3'). The reaction contained 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate and 2 mM MgSO₄ in HF buffer that was supplied with the enzyme (Phusion DNA polymerase, 1 U). Amplified DNA was purified by agarose gel electrophoresis and subsequent extraction from the gel. The PCR amplicon was ligated to pJET1.2, and several clones were sequenced to confirm predicted exon/intron junctions. For heterologous production of TrpM, *E. coli* KRX (Promega) and a codon-optimized gene (Invitrogen) were used that were inserted between the BamHI and XhoI sites of pET28a to create expression plasmid pFB06. The codon-optimized sequence is provided in Figure S10, and the genomic DNA sequence of *trpM* is deposited at GenBank under accession number MH423322.

Protein purification: Cultivation of *E. coli* and gene expression were performed as described.^[17] TrpM was purified by metal chelate affinity chromatography on Protino Ni²⁺-NTA agarose (Macherey-Nagel). Purification was verified by polyacrylamide gels (12% Laemmli gel), and protein concentrations were determined by Bradford's method.^[18] TrpM was desalted on a PD-10 column (GE Healthcare) and was equilibrated with buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) for enzyme assays. Production of *E. coli* S-adenosylhomocysteine nucleosidase and adenine deaminase^[6] by using pET28-based expression plasmids followed the same protocol, except that the *E. coli* culture to express the adenine deaminase gene was supplemented with 2,2'-bipyridine (50 μM) and MnCl₂ (1 mM). For size-exclusion chromatography, TrpM was eluted in phosphate buffer (10 mM sodium dihydrogen phosphate, 140 mM NaCl, pH 7.4). Size-exclusion chromatography was performed by FPLC (Äkta Pure 25, GE Healthcare) and a Superdex 200 increase 10/300 GL column with a 24 mL bed volume. Signals were referenced to the GE Healthcare high molecular weight standard.

Product formation by TrpM: In vitro TrpM assays were performed in triplicate in a volume of 200 μL, buffered in Tris-HCl (50 mM, pH 8.0); the enzyme concentration was 200 nM. The methyl acceptor (**3** or others) was added at a final concentration of 500 μM, and SAM was added at a final concentration of 1.5 mM. The reactions were incubated at 25 °C for 15 min. The time course with **3** as acceptor substrate included additional sampling in 30 s intervals from 0 to 150 s. The reaction with SAH-nucleosidase and adenine deaminase was incubated for 4 h. Reactions were stopped in liquid nitrogen and were then lyophilized, dissolved in MeOH, and centrifuged. The supernatant was collected for chemical analysis. TrpM kinetics were recorded by using the MTase-Glo luminescence assay (Promega).

Chemical analysis of TrpM assays: LC-MS (ESI) analyses of TrpM in vitro assays were performed with an Agilent Infinity 1260 instrument with a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (150 × 4.6 mm, 5 μM particle size, flow: 1 mL min⁻¹) coupled to an Agilent 6130 Single Quadrupole mass detector. Diode array detection was between λ = 200 and 400 nm. Chromatograms were extracted at λ = 280 nm. To analyze indolic compounds, the following linear gradient was applied with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O (solvent A) and methanol (MeOH, solvent B): initially 5% B, increased to 15% B within 5 min, to 37% B within another 13 min, and to 100% B within 1 min. LC-HRMS (ESI) was performed with a Thermo Accela liquid chromatograph coupled to an Exactive Orbitrap spectrometer operating in the positive and negative modes and equipped with a C₁₈ column. Solvent A was 0.1% (v/v) formic acid in H₂O, and solvent B was acetonitrile (MeCN). To analyze mycelial extracts for methylated L-phenylalanine, a Grom-Sil 100 ODS-0 AB, 250 ×

4.6 mm, 3 μ m particle size and the following conditions were used: initial hold at 5% B for 1 min, linear gradient to 100% B within 15 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹. For other analyses, a Betasil C₁₈ column (150 \times 2.1 mm, 3 μ m particle size) and these conditions were used: initial hold at 5% B for 1 min, linear gradient of 5–98% B within 15 min at a flow of 0.2 mL min⁻¹.

Chemical analysis of *P. serbica* extracts: To prepare mycelium for LC-HRMS (ESI) analyses, it was collected from liquid cultures by filtration, washed with distilled water, blotted dry, snap frozen in liquid nitrogen, homogenized with mortar and pestle, and shaken in MeOH (200 mL) for 18 h at 240 rpm before the biomass was removed by filtration and dried over sodium sulfate. Residual solvent was evaporated under reduced pressure. The dry residue was dissolved in MeOH, filtered, and subjected to LC-HRMS (ESI) measurements (see above).

Purification and NMR spectroscopy: From *in vitro* assays, **5** was purified in two steps two steps on an Agilent Infinity 1260 chromatograph. The first step was accomplished with an Eclipse XDB-C₁₈ column (250 \times 9.4 mm, 5 μ m particle size). H₂O+0.1% TFA was solvent A and MeOH was solvent B. A linear gradient (2 mL min⁻¹) was applied, beginning with 5% B, increased to 15% B in 5 min, to 37% B within 18 min, and to 100% B within 1 min. The second purification step included a Hypercarb column (150 \times 4.6 mm, 5 μ m), 0.1% TFA in H₂O as solvent A and MeCN as solvent B. A linear gradient (1 mL min⁻¹) was applied, beginning with 21% B and increased to 100% B in 9 min. The ¹H NMR spectrum of **5** was recorded at 300 K with a Bruker Avance III spectrometer at 500 MHz in D₂O. Chemical shifts were referenced to residual non-deuterated solvent (δ_H = 4.79 ppm).

Bioinformatic analysis: Initially, Blast^[19] and Augustus (v.3.3.1)^[20] software was used to browse the *P. serbica* genome.^[4a] Homologues of *trpM* were obtained from a local database of 540 fungal and oomycete proteomes by using usearch (v.8.0.1517)^[21] with TrpM (KDR66884.1) and EgtDB (KDR82860.1) from *G. marginata* as queries, an *e* value of 1 e^{-3} , and protein identity of 30%. The domain structure of the proteins was determined by using rpsblast (NCBI BLAST v.2.6.0+)^[19] to search the NCBI Conserved Domain Database (v.3.16)^[22] with an *e* value of 0.001. The absence of YfmG superfamily domains in the proteins was confirmed by tblastn against the respective genome assemblies by using the nearest EgtDB sequence from phylogenies (see below) as a query. MT_33 superfamily domains were extracted from protein sequences by using hmmer (v.3.1b2).^[23] MT_33 phylogenies were constructed by first aligning with mafft (v.7.221)^[24] and removing ambiguously aligned characters with Trimal (v.1.4)^[25] using the –automated1 method. Exploratory phylogenetic analyses were performed using fasttree (v.2.1.7).^[26] A well-supported clade consisting exclusively of Agaricomycetes was selected for subsequent analyses. For analyses of distant relatives of TrpM, hmmer was used to search for MT_33 domains (952 total) across the proteome database. Figure S9A (*P. tinctorius* EgtD) combines the same four additional Agaricomycetes rooting sequences along with near and distant clades of Boletales EgtDB/EgtD. Figure S9B (EasF) combines two clades of Pezizomycotina MT_33 homologues with two orthologues, each encoding Agaricomycetes TrpM and EgtDB for rooting. Figure S9C (oomycetes EgtD) combines a clade of early diverging fungi that includes oomycete EgtD sequences and the Agaricomycetes root. Datasets were realigned and curated as above, followed by maximum likelihood analysis using RAxML (v.8.2.9)^[27] with the model (LG) selected automatically according to Bayesian information criterion. Protein domains identified by rpsblast were mapped to the

Agaricomycetes PsiM2/EgtDB phylogeny using the ETE Toolkit (v.3.1.1).^[28]

Acknowledgements

We thank Andrea Perner, Heike Heinecke, Florian Baldeweg, and Hanno Schoeler (Hans Knöll Institute Jena) for recording high-resolution mass spectra, for recording and interpreting NMR spectra, and for luminescence measurements, respectively. Markus Gressler (Friedrich Schiller University Jena) is acknowledged for helpful comments on the manuscript. We also thank Francisco J. Ruiz-Dueñas, Ph.D. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain), José M. Barrasa, Ph.D. (Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain), David S. Hibbett, Ph.D. (Clark University, Worcester, MA, USA), Daniel Lindner, Ph.D. (US Dept. of Agriculture, Forest Service, Madison, WI, USA), and László Nagy, Ph.D. (Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary) for access to unpublished genome sequences; these data were produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute in collaboration with the user community. Evolutionary analyses were performed using the resources of the Ohio Supercomputer Center. This work was supported by a National Science Foundation grant (grant DEB-1638999 to J.C.S.) and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant HO2515/7-1 to D.H.). Work in D.H.'s laboratory was also funded by the Collaborative Research Center ChemBioSys (SFB1127).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: biosynthesis • enzymes • methyltransferase • psilocybin • tryptophan

- a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572; b) A. Y. Leung, A. H. Smith, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 1576–1579.
- a) D. E. Nichols, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *101*, 131–181; b) F. Hasler, U. Grimberg, M. A. Benz, T. Huber, F. X. Vollenweider, *Psychopharmacology* **2004**, *172*, 145–156.
- a) C. S. Grob, A. L. Danforth, G. S. Chopra, M. Hagerty, C. R. McKay, A. L. Halberstadt, G. R. Greer, *Arch. Gen. Psychiatry* **2011**, *68*, 71–78; b) M. W. Johnson, A. Garcia-Romeu, M. P. Cosimano, R. R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2014**, *28*, 983–992; c) A. M. Sherwood, T. E. Prisinzano, *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 1–3.
- a) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12352–12355; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524–12527; b) H. T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H. B. Korotkin, P. B. Matheny, J. C. Slot, *Evol. Lett.* **2018**, *2*, 88–101; c) F. Blei, F. Baldeweg, J. Fricke, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10028–10031.
- S. Ghosal, S. K. Dutta, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 195–198.
- a) A. Vit, L. Misson, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 119–125; b) L. Misson, R. Burn, A. Vit, J. Hildesheim, M. A. Beliaeva, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1333–1342; c) F. P. Seebeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6632–6633.
- a) T. Kawano, *Plant Cell Rep.* **2003**, *21*, 829–837; b) A. Jambois, A. Dauphin, T. Kawano, F. A. Ditegou, F. Bouteau, V. Legue, F. Lapeyrie, *Physiol. Plant.* **2005**, *123*, 120–129.
- A. Vit, L. Misson, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2014**, *70*, 676–680.

- [9] H. Chen, Z. Zhao, T. M. Hallis, Z. Guo, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 607–610.
- [10] D. S. Hibbett, M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, et al., *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 509–547.
- [11] D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martínez, R. Otillar, J. W. Spatafora, J. S. Yadav, et al., *Science* **2012**, *336*, 1715–1719.
- [12] G. W. Jones, S. Doyle, D. A. Fitzpatrick, *Gene* **2014**, *549*, 161–170.
- [13] S. Ohno, *Evolution by Gene Duplication*, 1st ed., Springer, Heidelberg, **1970**.
- [14] a) I. Wapinski, A. Pfeffer, N. Friedman, A. Regev, *Nature* **2007**, *449*, 54–61; b) J. H. Wisecaver, J. C. Slot, A. Rokas, *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004816.
- [15] G. Leonard, T. A. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 21402–21407.
- [16] M. Marcet-Houben, T. Gabaldón, *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *86*, 71–80.
- [17] D. Kalb, T. Heinekamp, S. Schieferdecker, M. Nett, A. A. Brakhage, D. Hoffmeister, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1813–1817.
- [18] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [19] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- [20] M. Stanke, R. Steinkamp, S. Waack, B. Morgenstern, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W309–W312.
- [21] R. C. Edgar, *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461.
- [22] A. Marchler-Bauer, M. K. Derbyshire, M. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L. Y. Geer, R. C. Geer, J. He, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, et al., *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D222–D226.
- [23] S. R. Eddy, *Bioinformatics* **1998**, *14*, 755–763.
- [24] K. Katoh, D. M. Standley, *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780.
- [25] S. Capella-Gutierrez, J. M. Silla-Martinez, T. Gabaldón, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1972–1973.
- [26] M. N. Price, P. S. Dehal, A. P. Arkin, *PLoS One* **2010**, *5*, e9490.
- [27] A. Stamatakis, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1312–1313.
- [28] J. Huerta-Cepas, F. Serra, P. Bork, *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1635–1638.

Manuscript received: June 22, 2018

Accepted manuscript online: August 11, 2018

Version of record online: October 2, 2018

Supporting Information

Iterative L-Tryptophan Methylation in *Psilocybe* Evolved by Subdomain Duplication

Felix Blei,^[a] Janis Fricke,^[a] Jonas Wick,^[a] Jason C. Slot,^{*,[b]} and Dirk Hoffmeister^{*,[a]}

cbic_201800336_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of Contents

Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of TrpM	2
Figure S2. Size exclusion chromatography with TrpM	3
Figure S3. Time course of TrpM-catalyzed product formation	4
Figure S4. ¹ H NMR spectrum of <i>N,N</i> -dimethyl-L-tryptophan	5
Figure S5. Mass spectrometric analysis of <i>in vitro</i> TrpM substrate specificity tests	6
Figure S6. Mass spectrometric analysis of <i>P. serbica</i> extracts	7
Figure S7. Phylogeny and structure of MT_33 domain-containing proteins	8
Figure S8. Alignment of <i>Psilocybe serbica</i> TrpM with <i>P. cyanescens</i> ψ TrpM	11
Figure S9. Phylogenies of distant paralogs of TrpM	12
Figure S10. Codon-optimized sequence of <i>trpM</i>	15

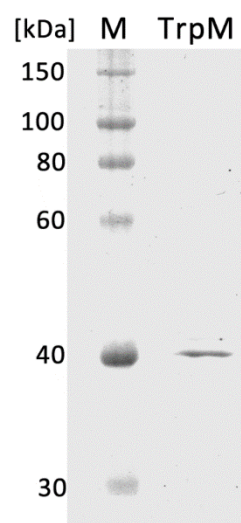


Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with recombinantly produced hexahistidine-tagged *Psilocybe serbica* tryptophan methyltransferase TrpM. M: Molecular weight marker, sizes are indicated. The expected mass of *N*-terminally His-tagged TrpM is 43.2 kDa.

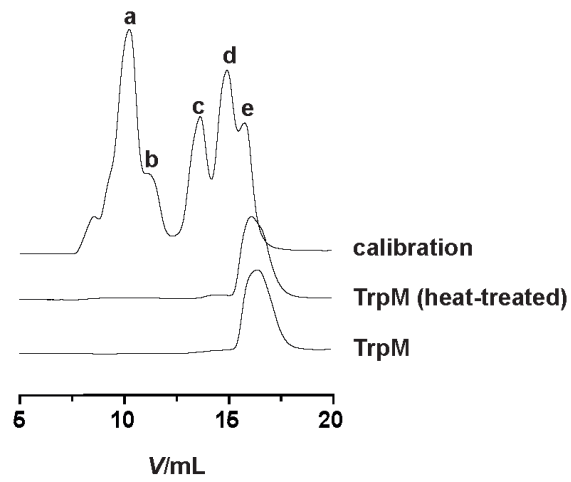


Figure S2. Size exclusion chromatography with intact and heat-treated *Psilocybe serbica* methyltransferase TrpM. Proteins were loaded onto a Superdex 200 column and eluted using 10 mM phosphate buffer with 140 mM NaCl. Heat-treated TrpM enzyme eluted at 16.2 mL (corresponding to ca. 42 kDa), the untreated active enzyme appeared at the same volume, *i.e.*, the approximate mass of monomeric TrpM. The calculated mass of monomeric *N*-terminally His-tagged TrpM is 43.2 kDa. The calibration track includes thyroglobulin (a, 669 kDa), ferritin (b, 440 kDa), aldolase (c, 158 kDa), conalbumin (d, 75 kDa), and ovalbumin (e, 43 kDa).

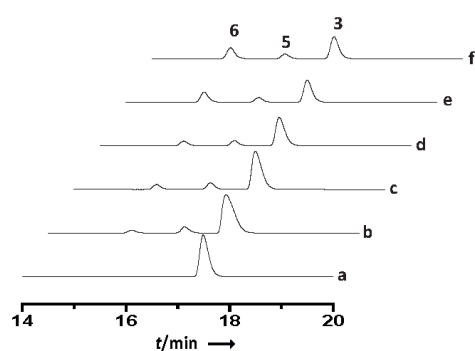


Figure S3. Time course of the TrpM reaction over 150 s. The chromatographic analysis shows simultaneous L-tryptophan (**3**) mono- and dimethylation (**4**: L-abrine, **5**: *N,N*- α -dimethyl-L-tryptophan). Trace a: negative control (heat-inactivated enzyme); traces b-f: reactions stopped after 30, 60, 90, 120, and 150 s, respectively.

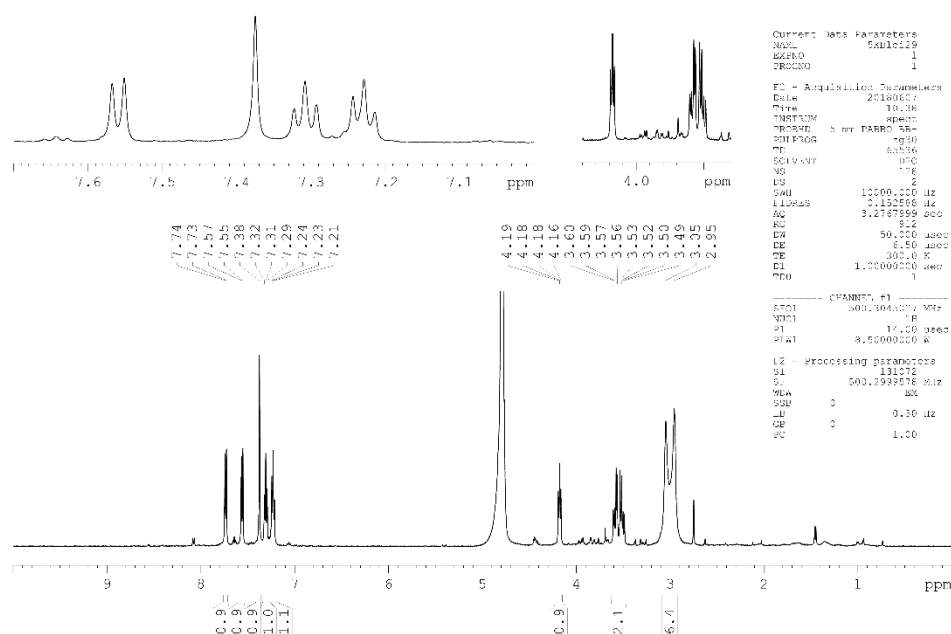


Figure S4. ^1H NMR spectrum (500 MHz, recorded in D_2O at 300 K) of *N,N*- α -dimethyl-L-tryptophan (**5**) as product of TrpM.

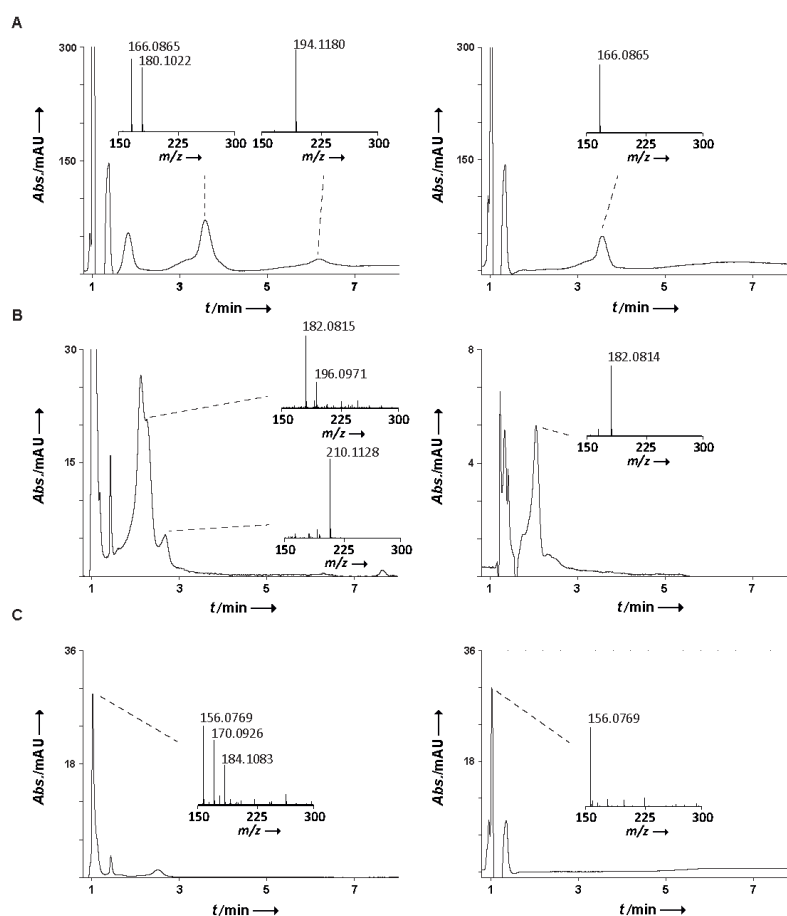


Figure S5. LC/MS analyses of *in vitro* substrate specificity tests with TrpM. The analyses were run in positive mode.

A) Left panel: detection of L-phenylalanine, m/z 166.0865 $[M+H]^+$ (calculated: 166.0868) and its monomethylated congener (m/z 180.1022 $[M+H]^+$, calculated: 180.1025) at $t_R=3.7$ -3.8 min, and detection of dimethylated L-phenylalanine with m/z 194.1180 $[M+H]^+$ (calculated: 194.1181) at $t_R=6.2$ min. Right panel: negative control with heat-treated TrpM ($t_R=3.7$ min).

B) Left panel: detection of L-tyrosine, m/z 182.0815 $[M+H]^+$ (calculated: 182.0817), monomethylated L-tyrosine (m/z 196.0971 $[M+H]^+$, calculated: 196.0973) at $t_R=2.1$ -2.2 min, and detection of dimethylated L-tyrosine with m/z 210.1128 $[M+H]^+$ (calculated: 210.1130) at $t_R=2.7$ min. Right panel: negative control ($t_R=2.1$ min).

C) Left panel: detection of L-histidine, m/z 156.0769 $[M+H]^+$ (calculated: 156.0773), monomethylated L-histidine (m/z 170.0926 $[M+H]^+$, calculated: 170.0929), and dimethylated L-histidine (m/z 184.1083 $[M+H]^+$, calculated: 184.1086) ($t_R=1.0$ min). Right panel: negative control ($t_R=1.0$ min).

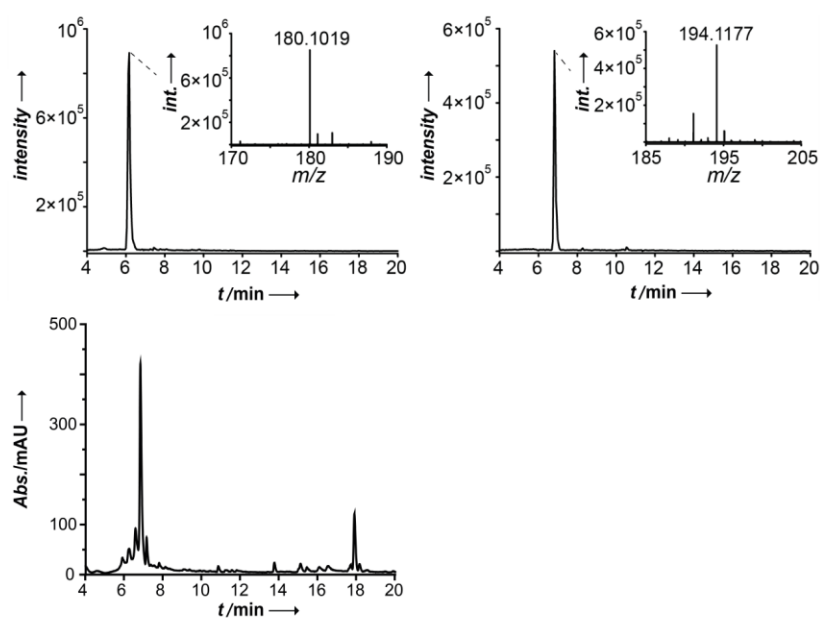
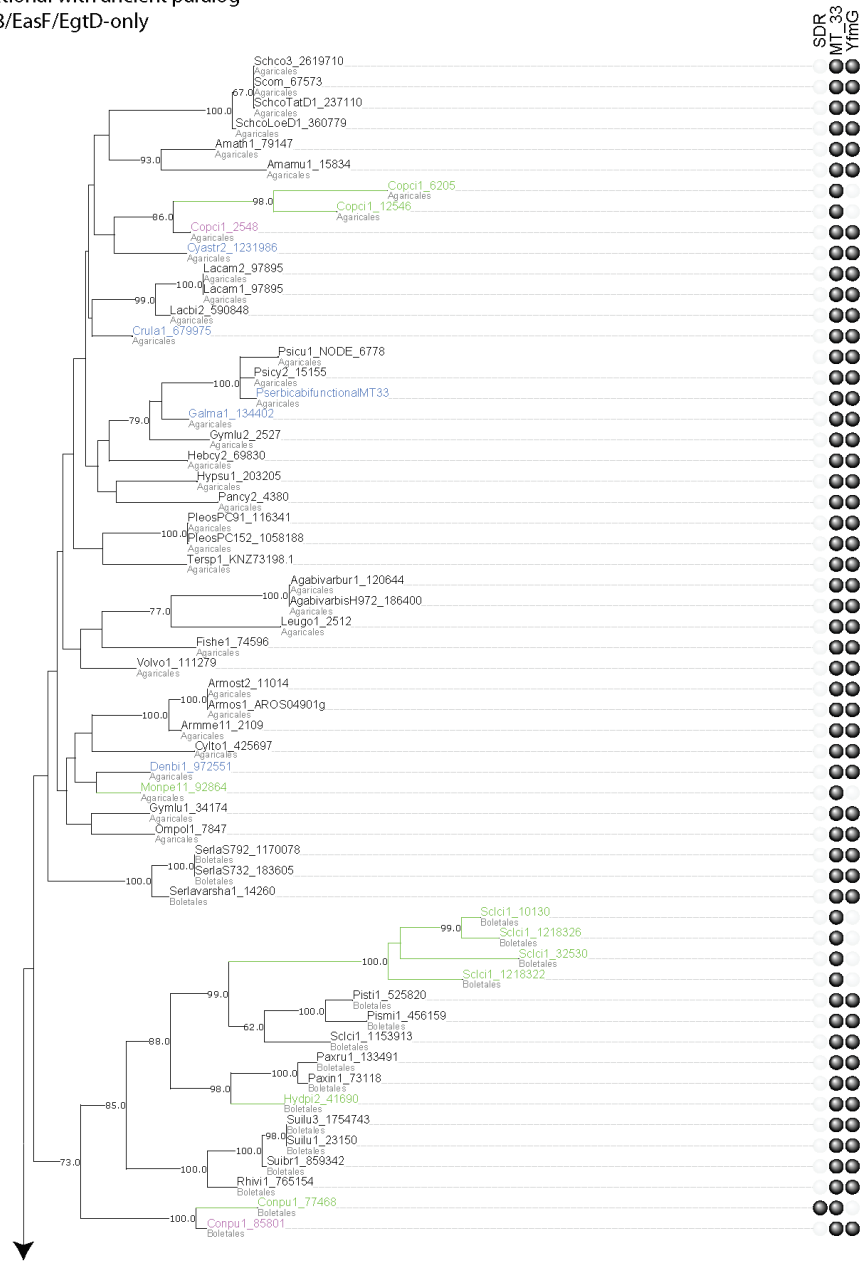


Figure S6. LC/MS analyses of *P. serbica* extracts to detect methylated L-phenylalanine. Upper left panel: extracted ion chromatogram for m/z 180-181. At $t_R=6.2$ min, the mass of monomethylated L-phenylalanine, (m/z 180.1019 $[M+H]^+$, calculated: 180.1025) was detected. Upper right panel: extracted ion chromatogram for m/z 194-195. The detected mass at $t_R=6.8$ min (m/z 194.1177 $[M+H]^+$, calculated: 194.1181) is consistent with dimethylated L-phenylalanine. Lower panel: corresponding HPLC trace.

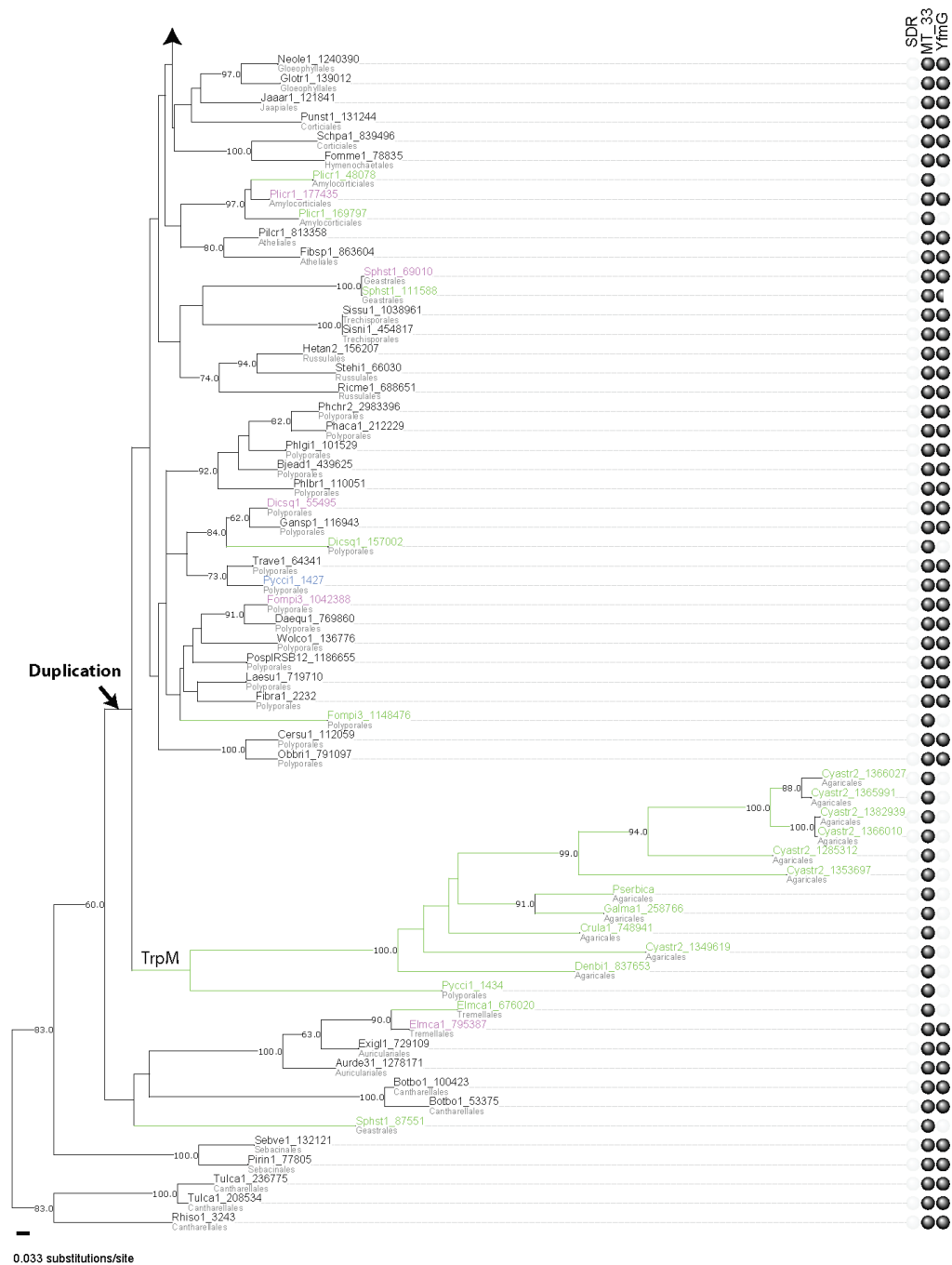
A

MT_33 Phylogeny

- bifunctional
- bifunctional with recent paralog
- bifunctional with ancient paralog
- MT_33/EasF/EgtD-only



8



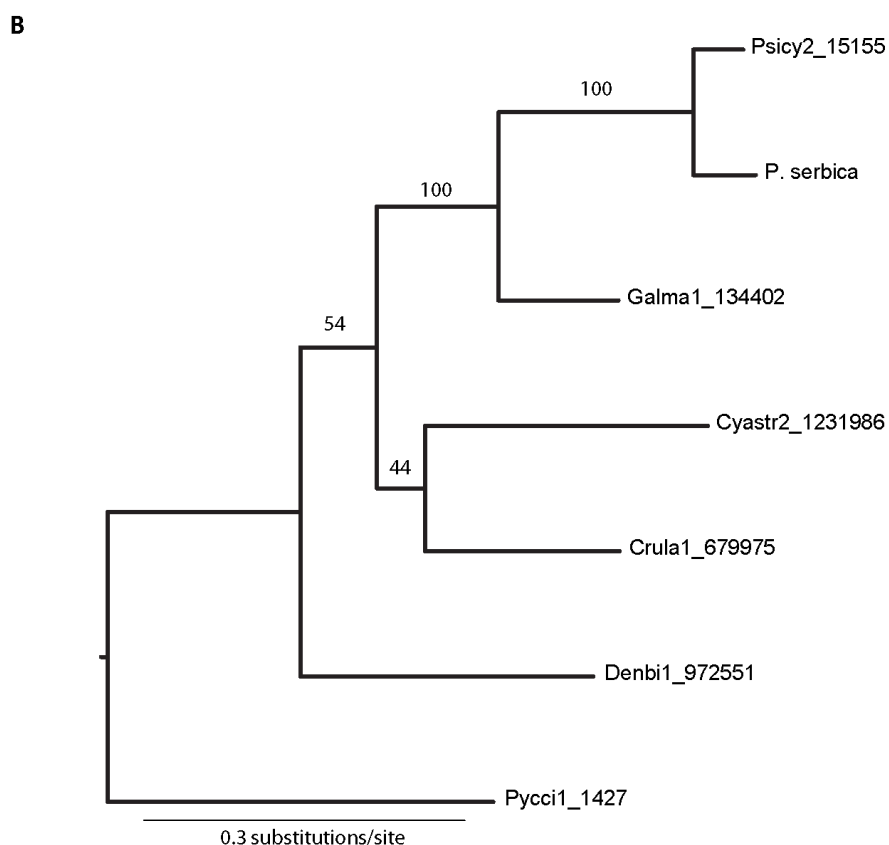
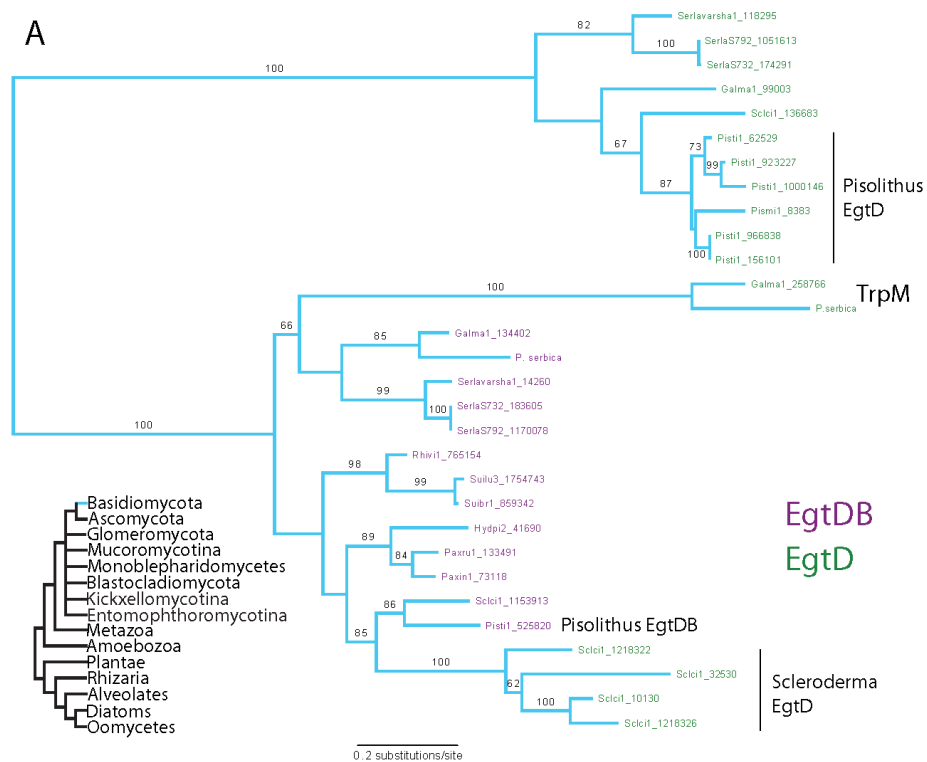
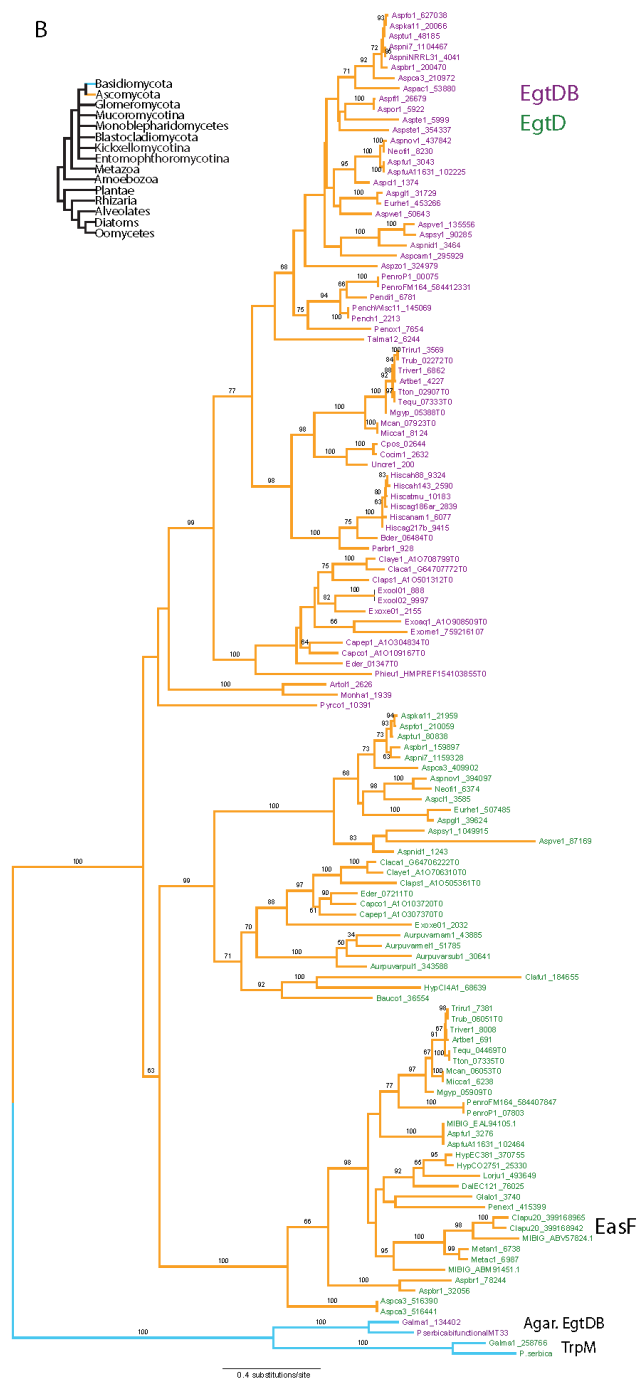


Figure S7. Phylogeny and structure of MT₃₃ domain containing proteins in Agaricomycetes.
 A) Maximum likelihood phylogeny (left) indicates protein model accessions (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi>), and fungal order. Node support is out of 100 maximum likelihood bootstrap replicates (see Methods). (Putative) monofunctional methyltransferase terminals are in green, while bifunctional are in black (no paralog in this phylogeny), violet (has recent monofunctional paralog), or blue (has ancient monofunctional paralog, i.e. TrpM). Domain presence is indicated to the right (SDR = Short-chain dehydrogenases/reductases, MT₃₃ = Histidine-specific methyltransferase, SAM-dependent [EgtD], and YfmG = Formylglycine-generating enzyme, required for sulfatase activity, contains SUMF1/FGE domain [EgtB]). B) Maximum likelihood phylogeny of EgtDB from genomes with TrpM.

<i>P. serbica</i>	MPRIQVLDIRGSKESVGSTPHLRAAILEGLLKPPGSRTPSETLYDEVGLKM
<i>P. cyanescens</i>	MLLIQVLDIRESKDSLGSIPHLQTAILEGLLKPPGNRTLPSETLYDEVGLKM
consensus	M.hIQVLDIRtSK-SlGShPHLpsAILEGLLKPPGsRTLPSETLYDEVGLKM
<i>P. serbica</i>	YNDGMKAWAEWYYPVEAERQILERYGRDIAKLFTTSAGKAVLIELGAGSLD
<i>P. cyanescens</i>	YNGRMKAWAEWYYPVKAERQILELYGSEITKLFNTSANGNTVLIELSAGSLD
consensus	YNstMKAWAEWYYPVcAERQILEhYgp-IsKLFsTSApGpsVLIELuAGSLD
<i>P. serbica</i>	KTSQVLLSAAEITRTTGPMMNIAYYALDLERGELEERTIGRLQEVIQDQIAGK
<i>P. cyanescens</i>	KTLQILLSAADQIS--GVAGTIKYALDLERSELEHTIGRLQDIIGD* IAGK
consensus	KT.QllLSAA-.h..oGshssItYyALDLERuELE+TIGRLQ-lIGD.IAGK
<i>P. serbica</i>	ISTAGMWGTYDDGIRVIEKNELELEPDIPVHILFLGGTIGNFSKQDGDVAFI
<i>P. cyanescens</i>	IDTVGLWGTYNdgIRIiKkNELGLEPNTPIHILFLGGTIGNFSKQDDDVAFI
consensus	IsTsGhWGTysDGIRlIcKNEltLEPshPlHILFLGGTIGNFSKQDsDVAFL
<i>P. serbica</i>	KSLPLDHKRGDTLLVGMDRHKSAIAERSYGFAAAKDWIMNGLKVSGRVLTG
<i>P. cyanescens</i>	KSLPLDSRRGDTLLIRMDRIKPADIIERAYGFAAAEKWIIRKLPVSGRYHWK
consensus	KSLPLDp+RGDTLLltMDRhKsAdhIERuYGFAAAccWIhptL.VSGRhhht
<i>P. serbica</i>	DEGLFEIGNWERYAKYNEELGRYEAGYKSQKEHALKISEGVDITFLKDEVVL
<i>P. cyanescens</i>	LQQAR*-----
consensus	.pthh.
<i>P. serbica</i>	VMFSNKYTDaEMDSVVDsAGLVKNGSWMDEKAQYCLLSLRANNGPV*
<i>P. cyanescens</i>	-----
consensus	

Figure S8. Alignment of *Psilocybe serbica* TrpM with the *P. cyanescens* pseudogene (ψ TrpM). *P. serbica* TrpM was confirmed by cDNA sequence, and *P. cyanescens* ψ TrpM is the best conceptual translation of the corresponding genomic region. Inferred stop codons (asterisks) are highlighted red. In the consensus, lower-case letters indicate o = alcohol, l = aliphatic, c = charged, h = hydrophobic, - = negative, p = polar, + = positive, s = small, u = tiny, and t = turnlike amino acid residues.





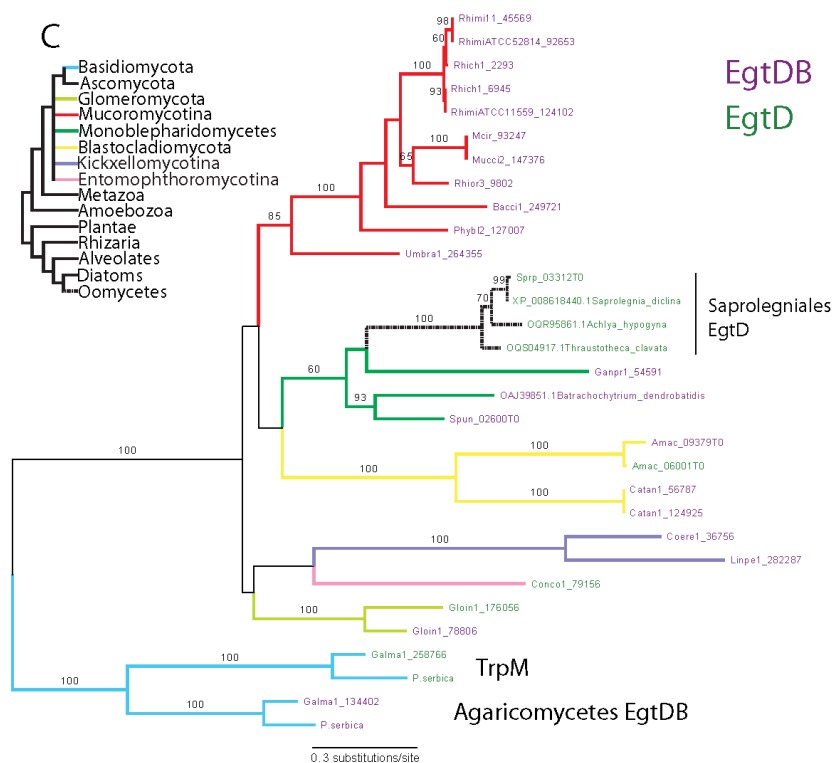


Figure S9. Phylogenies of distant paralogs of TrpM. Maximum likelihood phylogenies indicate protein model accessions (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi>, NCBI) for A) distant EgtD paralogs in Boletales, or B) distantly related EgtD paralogs in Ascomycota, including EasF, or C) in Saprolegniales. EgtD proteins are in green, and paralogous EgtDB proteins are in violet. Node support is out of 100 maximum likelihood bootstrap replicates (see Methods). Inset phylogeny is based on Hibbett et al.^[1] and Burki et al. (2012).^[2]

[1] D.S. Hibbett, M. Binder, J.F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon, O.E. Eriksson, et al., *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 509-547.

[2] F. Burki, N. Okamoto, J.F. Pombert, P.J. Keeling, *Proc Royal Society of London B: Biological Sciences*, **2012**, rspb20112301.

ATGCCTCGTATTTCAGGTTCTGGATATTCGTGGTAGCAAAGAAAGCGTTGGTAGCACACCGCATCTGCGT
 GCAGCAATTCTGGAAGGTCTGCTGAAACCGCCTGGTAGCCGTACCCTGCCGAGCGAAACCTGTATGAT
 GAAGTTGGTCTGAAAATGTATAACGACGGTATGAAAGCATGGGCAGAATGGTATTATCCGGTTGAAGCA
 GAACGTCAGATTCTGGAACGTTATGGTCGTGATATTGCCAAACTGTTTACCACCAGTGCAAAAGGTAAAG
 CCGTTCTGATTGAACTGGGTGCAGGTAGCCTGGATAAAACCAGCCAGGTTCTGCTGAGCGCAGCCGAA
 ATTACCCGTACCACCGGTCCGATGAATAACATTGCATATTATGCACTGGATCTGGAACGCGGAGAACTG
 GAACGTACCATTTGGTCGTCTGCAAGAAGTTATTGGCGATCAGATTGCAGGTAAAATTAGCACCGCAGGT
 ATGTGGGGCACCTATGATGATGGTATTCTGTGATTGAAAAAACGAGCTGGAACCTGGAACCGGATATT
 CCGGTGCATATTCTGTTTCTGGGTGGCACCATTGGTAATTTTAGCAAACAGGATGGTGATGTGGCATTTC
 TGAAGAGCCTGCCGCTGGATCATAAACGTGGTGATACCCTGCTGGTTGGTATGGATCGTCATAAAGCG
 CAGATGCAATTGAACGTAGCTATGGTTTTGCAGCAGCAAAAGATTGGATTATGAATGGCCTGAAAGTTAG
 CGGTCTGTTCTGACCGGTGATGAAGGTCTGTTTGAAATTGGCAATTGGGAACGCTATGCCAAATACAAT
 GAAGAACTGGGTCTGTTATGAAGCCGTTATAAAGCCAGAAAGAACATGCACTGAAAATTAGCGAAGGT
 GTGGATATTACCTTCCTGAAAGATGAAGTGGTTCTGGTGATGTTGAGCAACAAATATACCGATGCAGAAA
 TGGATAGCGTTGTTGATAGCGCAGGTCTGGTTAAAAATGGTAGCTGGATGGATGAAAAAGCCCAGTATT
 GCCTGCTGAGCCTGCGTGCAATAATGGTCCGGTTTAA

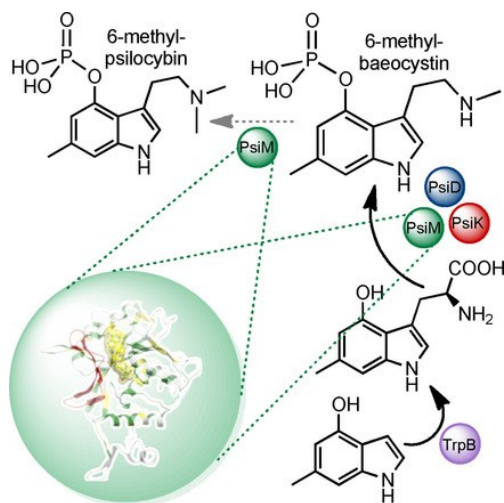
Figure S10. Codon-optimized cDNA sequence of the *Psilocybe serbica trpM* gene.

3.4 Enzymatic production of 6-methylated baeocystin and psilocybin

Janis Fricke, Alexander Sherwood, Robert Kargbo, Andrew Orry, **Felix Blei**, Andreas Naschberger, Bernhard Rupp, Dirk Hoffmeister

ChemBiochem, Band 20, Ausgabe 22, Seiten 2824-2829, 2019

Zusammenfassung



Unter Verwendung der Psilocybin Biosyntheseenzyme aus *P. cubensis* konnte mittels *in vitro*-Ansätzen erstmalig 6-Methyl-Baeocystin und 6-Methyl-Psilocybin hergestellt werden. Das Substrat 4-Hydroxy-6-Methyl-L-Tryptophan wurde durch die TS aus *Salmonella enterica* hergestellt und wird erst durch PsiD decarboxyliert, anschließend durch PsiK phosphoryliert und dann durch die Methyltransferase PsiM methyliert. Durch die strikte

Spezifität der Methyltransferase, verglichen mit dem natürlichen Substrat, kommt es zu einer Präferenz von Einfach-Methylierungen. Mittels *in silico* Modell von PsiM kann ein konservierter Bereich der SAM-Bindungsstelle nachgewiesen werden, es sind jedoch umliegende nicht konservierte Bereiche, welche als Ursache für die strikte Substratspezifität vermutet werden.

Angaben zum Eigenanteil: 10 %

Aufreinigung von 6-Methylbaeocystin mittels präparativer und semipräparativer HPLC für anschließende NMR-spektroskopische Untersuchungen

Jena, den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

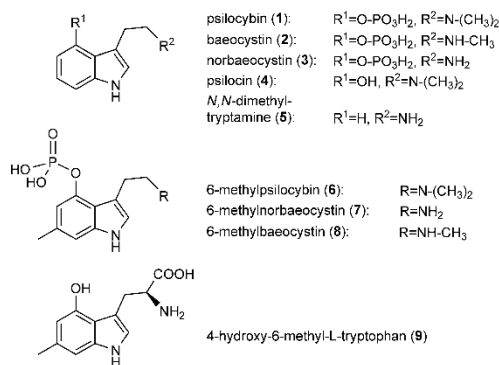
Enzymatic Route toward 6-Methylated Baecocystin and Psilocybin

Janis Fricke,^[a] Alexander Sherwood,^[b] Robert Kargbo,^[b] Andrew Orry,^[c] Felix Blei,^[a] Andreas Naschberger,^[d] Bernhard Rupp,^[d, e] and Dirk Hoffmeister^{*,[a]}

Psilocybin and its direct precursor baecocystin are indole alkaloids of psychotropic *Psilocybe* mushrooms. The pharmaceutical interest in psilocybin as a treatment option against depression and anxiety is currently being investigated in advanced clinical trials. Here, we report a biocatalytic route to synthesize 6-methylated psilocybin and baecocystin from 4-hydroxy-6-methyl-L-tryptophan, which was decarboxylated and phosphorylated by the *Psilocybe cubensis* biosynthesis enzymes PsiD and PsiK. N-Methylation was catalyzed by PsiM. We further present an in silico structural model of PsiM that revealed a well-conserved SAM-binding core along with peripheral non-conserved elements that likely govern substrate preferences.

The indole nucleus is a common motif with bioactive natural products that is, in numerous instances, modified during biosynthesis. Modifications include, for example, 7-chlorination in the case of rebeccamycin, prenyl transfer to various positions to make asteriquinones, or hydroxylation at C-5 and C-6 of serotonin and amanitins, respectively. Reserpine, ibogaine, and harmaline are methoxy-substituted at these carbons. Dissimilar from the above positions and substituents, psilocybin (**1**, Scheme 1) features a unique 4-phosphoryloxy group.

Compound **1** is the principal metabolite of *Psilocybe* carpophores ("magic mushrooms"), whereas baecocystin (**2**) and norbaecocystin (**3**), the immediate metabolic precursors, are present in minor quantities.^[1] The dephosphorylated analogue of **1**, psilocin (**4**), represents the pharmacologically active, that is, psychotropic compound as it is a partial agonist at the human 5HT_{2A} receptor.^[2] The pharmaceutical value of **1** in the treat-



Scheme 1. Chemical structures of psilocybin and other naturally occurring or synthetic L-tryptophan derivatives relevant to this study.

ment of end-of-life anxiety and therapy refractory depression has been documented in various advanced clinical trials.^[3] Syntheses of **1** congeners date back to the late 1950s. Following the discovery of **1** by Albert Hofmann and co-workers, various series of derivatives were synthesized, which also contained the 6-phosphoryloxy and 6-hydroxy isomers of **1** and **4**, along with a 6-methylated, side-chain-alkylated tryptamine.^[4] Subsequent efforts were made to install bromine or a formyl group at C-5- or C-7, vary the substituents at the ω-N-atom of **4**, or add various substituents to the aromatic ring of *N,N*-dimethyl-tryptamine (**5**), to produce its 6- and 7-methyl analogues, among others.^[5] Despite these results and despite the synthesis of 2-methyl derivatives of **5** and *N,N*-diethyltryptamine,^[6] none of the previous efforts, using synthetic chemistry, had focused on introducing a methyl substituent to the indole of **1** or **2**.

We report the in vitro synthesis of 6-methylpsilocybin (**6**, Scheme 1) and, as main products, its immediate precursors 6-methylnorbaecocystin (**7**) and 6-methylbaecocystin (**8**). We address the previous lack of ring-methylated **1** analogues and simultaneously provide a model of the PsiM structure for insight into the origin of its methylating activity on **3** and **7**. We identified a loop structure as critical for methyl acceptor substrate selectivity. Concurrent site-directed *psiM* mutagenesis experimentally validated the structural model.

Four enzymes, the decarboxylase PsiD, the P₄₅₀ monooxygenase PsiH, the kinase PsiK, and the iteratively acting *N*-methyltransferase PsiM, confer the capacity to biosynthesize **1**.^[7] Based on this finding, a biocatalytic route was reported that

[a] J. Fricke, F. Blei, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmaceutical Microbiology at the Hans Knöll Institute
Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

[b] Dr. A. Sherwood, Dr. R. Kargbo
The Usona Institute
2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711 (USA)

[c] Dr. A. Orry
Molsoft L.L.C.
11199 Sorrento Valley Road, San Diego, CA 92121 (USA)

[d] Dr. A. Naschberger, Dr. B. Rupp
Department of Genetic Epidemiology, Medizinische Universität Innsbruck
Schöpfstrasse 41, 6020 Innsbruck (Austria)

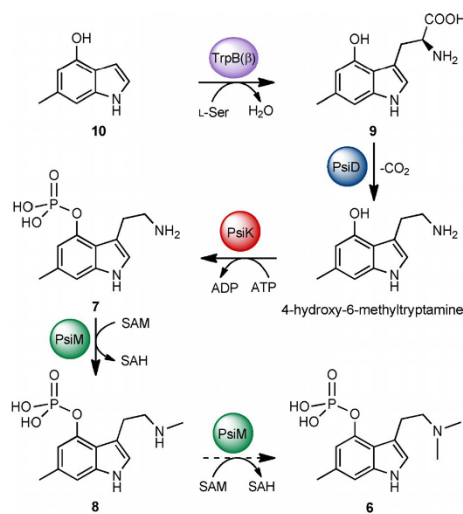
[e] Dr. B. Rupp
Hofkristallamt
991 Audrey Place, Vista, CA 92084 (USA)

Supporting information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/cbic.201900358>.

makes use of tryptophan synthase *P. cubensis* TrpB, alongside PsiD, PsiK, and PsiM, to produce **1** in vitro from 4-hydroxyindole and L-serine.^[8] The intrinsic substrate flexibility of TrpB, PsiD, and—to a lesser extent—PsiK, allowed successful conversion of 5- and 7-hydroxyindole into serotonin or isonorbaecystin (=7-phosphoryloxynorbaecystin). However, the strictly specific methyltransferase PsiM prevented further turnover, and 6-hydroxyindole processing failed altogether at the initial TrpB-catalyzed step. We re-investigated the above enzymatic route and tested if recombinantly produced *P. cubensis* TrpB converted 4-hydroxy-6-methylindole (**10**), together with L-serine as second substrate, to 4-hydroxy-6-methyl-L-tryptophan (**9**, Scheme 1). However, UHPLC/MS analysis did not indicate product formation (Figure 1 A), whereas a positive control with indole and L-serine yielded L-tryptophan, as expected. The assay was repeated with TRP5, the tryptophan synthase of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).^[9] Its 2124 bp cDNA was cloned to heterologously produce the enzyme (monomeric mass of the N-terminally hexahistidine-tagged fusion protein: 79.1 kDa, Figure S1 in the Supporting Information). In the TRP5-containing assays, product formation was observed, albeit at low yields (Figure 1 B).

Previously, *Salmonella enterica* tryptophan synthase had been shown to accept 6-methylindole as substrate.^[10] As disubstituted indoles had not been tested then, we included this enzyme in our in vitro study. The positive control was run with unsubstituted indole. A product peak at $t_R = 3.8$ min, with a mass of m/z 235.1 [$M+H$]⁺ and a tryptophan-like UV/Vis spectrum, indicated successful conversion of **10** into **9** (Figure 1 C).

To scale up the production for subsequent reactions, we continued with the *S. enterica* enzyme to produce **9**. It was used for a one-pot reaction with recombinantly produced and N-terminally hexahistidine-tagged PsiD, PsiK, PsiM, and the appropriate co-substrates (Scheme 2). Substrate **9** was added at



Scheme 2. Enzymatic synthesis of 4-hydroxy-6-methyl-L-tryptophan (**9**) by *S. enterica* tryptophan synthase and subsequent conversion by *P. cubensis* decarboxylase PsiD, kinase PsiK, and methyltransferase PsiM into 6-methylbaecystin (**7**), 6-methylbaecystin (**8**), and 6-methylpsilocybin (**6**). The dashed arrow indicates low turnover to **6**.

1 mM to the reaction. After 4 h of incubation, UHPLC/MS analysis unequivocally detected two major new compounds that showed the typical tryptophan fingerprint UV/Vis spectrum, and a third compound in trace quantity. The first signal ($t_R = 1.4$ min, Figure 2) corresponded to a mass of m/z 271.0842 [$M+H$]⁺, the second one ($t_R = 2.1$ min) to m/z 285.0998 [$M+H$]⁺. These two masses are identical to those of **2** and **1**.

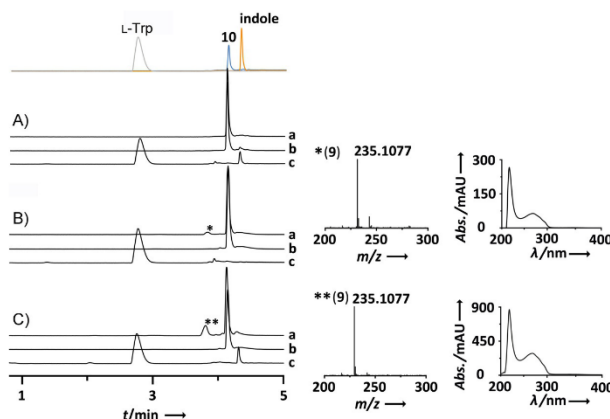


Figure 1. Formation of 4-hydroxy-6-methyl-L-tryptophan (**9**) by tryptophan synthases. Chromatograms were recorded at $\lambda = 280$ nm, HRMS(ESI) spectra were recorded in positive mode. Top: overlaid individual chromatograms of authentic reference compounds. Reactions with A) *P. cubensis* TrpB, B) *S. cerevisiae* TRP5, and C) *S. enterica* tryptophan synthase. Traces a: enzymatic reaction, b: negative controls with heat-treated enzyme, c: positive control yielding L-tryptophan. Right: UV/Vis spectra of the peaks marked with asterisks.

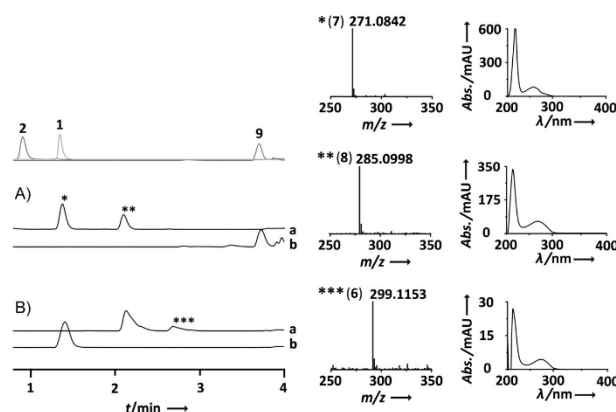
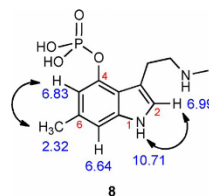


Figure 2. Analysis of enzymatic assays to produce 6-methylated psilocybin and congeners. Chromatograms were recorded at $\lambda = 280$ nm, HRMS(ESI) spectra were recorded in positive mode. Top: overlaid individual chromatograms of reference compounds. Reactions with A) PsID, PsIK, and PsIM; B) 6-methylnorbaeocystin (7) and PsIM, SAH nucleosidase, and adenine deaminase. Traces a: enzymatic reaction, b: negative controls with heat-treated enzyme. Minor additional signals around 4.0 min are follow-up products of instable 9. Retention times and other details are shown in Table S1. Right: UV/Vis spectra of the peaks marked with asterisks.

However, due to dissimilar retention times ($t_R = 0.9$ and 1.4 min) of authentic **2** and **1**, we could discount the possibility that these known tryptamines had been formed. The above masses were also compatible with **8** and its precursor **7**. A negative control with heat-treated enzymes did not show turnover (Figure 2).

For further verification, MS/MS analysis was performed (Figure S2). Fingerprint fragments typical for **1** and related tryptamines were detected: besides the phosphate group, the fragment losses for the side-chain amino group— H_3N in **7**, CH_3NH_2 in **8**, and $(CH_3)_2NH$ in **6**—were found. These losses verified the primary amine of **7**, and the degree of N-methylation in **8** and **6**. Furthermore, the detected fragment ions 162.0915 for $(C_{10}H_{12}NO)^+$ and 174.0915 for $(C_{11}H_{12}NO)^+$ were consistent with retention of the methyl and hydroxy substitution on the indole core provided by substrate **10**.

Additionally, a scaled-up enzymatic reaction with PsID, PsIK and, separately, with PsIM was carried out that yielded approximately 1 mg of compound after partial chromatographic purification. Subsequent 1D and 2D 1H NMR analysis provided evidence supporting the successful biocatalytic synthesis of **8**. The 1H NMR and COSY spectra (Figures S3 and S4) revealed three aromatic signals as well as a singlet at 10.71 ppm, indicative of the H-1 indole N-H, each with an integration value corresponding to one proton. The singlet at 6.99 ppm corresponded to H-2, and distinct singlet signals at 6.83 and 6.64 ppm corresponded to H-5 and H-7, respectively. Finally, a singlet that integrated to 3H at 2.32 ppm was consistent with the methyl group attached to position 6 of the indole core. COSY revealed coupling between indole protons H-1 and H-2. Additionally, a weak long-range coupling was observed between the aromatic methyl singlet at 2.32 ppm and the *ortho*-aromatic proton H-5 at 6.83 ppm (Scheme 3).



Scheme 3. Selected 1H NMR shifts (blue) and COSY correlations (black arrows) supporting the structural assignment of **8**.

The above data, taken collectively with high-resolution mass spectra, provided strong support for the structural assignment of **8** made by biocatalytic synthesis. Still, our triple-enzyme process had primarily yielded a monomethylated, that is, secondary amine (Figure 2A), while the *N,N*-dimethylated product **6** was formed only in traces.

To exclude the possibility that *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH), the second product of the PsIM reaction, might have accumulated and inhibited the second methyltransfer, the PsIM reaction was repeated as a single-enzyme assay with **8** as substrate and in the presence of SAH nucleosidase and adenine deaminase. This procedure irreversibly eliminates SAH from the equilibrium. Still, the *N,N*-dimethylated product **6** was detected only in minor amounts under these conditions and identified by LC/MS (Figure 2B). This observation contrasts with other methyltransferases that act on α -amino groups during natural product assembly. The well-understood gateway enzyme of the mycobacterial ergothioneine pathway, EgtD,^[11] catalyzes *L*-histidine trimethylation.

In the crystal structure of EgtD, residue Asn166 was recognized as being essential to making the *N,N*- α -dimethyl-L-histi-

dine intermediate a 100-fold stronger ligand than L-histidine itself, which promotes trimethylation. A similar enzyme, Ybs of *Aspergillus nidulans*, preferentially trimethylates L-tyrosine, but also L-histidine, L-DOPA, and L-phenylalanine.^[11a] The phylogenetically related *Psilocybe serbica* methyltransferase TrpM, which is not part of **1** biosynthesis, dimethylates the amino groups of L-tryptophan, L-tyrosine, and L-phenylalanine, but transfers a third methyl group only very poorly.^[12] Despite their being substrate flexible, kinetics and affinity determine the number of methyl groups transferred by the above enzymes, whereas the number of catalytic cycles was independent of the acceptor compound. Here, turnover with *P. cubensis* PsiM, an established *N,N*-dimethyltransferase acting on **3**, strongly decreases after one methyltransfer when **8** is offered as substrate.

To address this phenomenon more profoundly, the PsiM structure was modeled. PsiM is a class I S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent natural product *N*-methyltransferase and is active as a monomer, as shown by size-exclusion chromatography (Figure S5). Methyltransferases share a common Rossmann-like fold containing the SAM binding site with a highly conserved xGxG motif in a turn and a carboxylate residue anchoring the nucleoside ribose of SAM,^[13] but often share as little as 10% sequence identity.^[14] Interestingly, PsiM has no basic sequence similarity to the *N*-methyltransferases involved in tryptamine methylation in neurotransmitter biosynthesis, such as human phenylethanolamine *N*-methyltransferase (hPNMT). In contrast, PsiM shows sequence identity of $\approx 40\%$ with human small nuclear RNA MTs (METTL6) and human MT 10 domain containing protein (annotated as METTL10D and including residues 40–291 of METTL6). Basic SwissModel threading models^[15] expectedly show reasonable quality in the Rossmann fold core (residues 37–188 and 222–289), but uncertainty remains in the poorly aligned loop and N-terminal region.

We selected the SAH-containing high-resolution X-ray structure PDB ID: 2H00^[16] with 43% sequence identity as a template for homology modeling with ICM Pro and used the SAH pose of 2H00 as initial starting template for SAM docking (Figures 3 and S6).

The model shows that access to the conserved Rossmann-like SAM-harboring fold is likely determined by the central loop domain, which, in absence of a template structure, cannot be reliably modeled. The role of the N-terminal extension distal to the SAM-binding site is also unknown for PsiM, and the model must remain tentative. In the well-conserved core structure, the leaving methyl group of SAM is fittingly extending from the binding pocket into the lumen of the pocket environment (Figures 3 and S7), and the extraordinary specificity of PsiM must necessarily originate in the structural details of the remaining pocket-forming and substrate-presenting groups as well as protein side chains of the loop domain. As PsiM's substrate specificity is largely determined by the additional nonconserved structure parts that cannot be reliably modeled, any *in silico* substrate docking based on a homology model remains speculative, and a structural basis for the different activities of PsiM for 6-substituted tryptamines versus non-

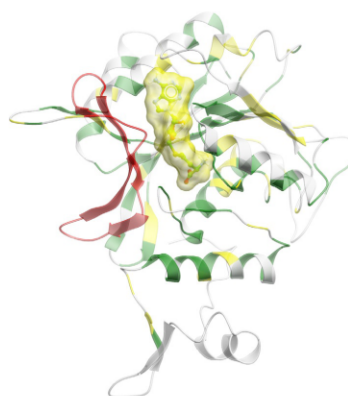


Figure 3. Homology modeling of *P. cubensis* PsiM (ribbons) with docked SAM (ball and stick model in yellow macrosphere) showing the conservation of the Rossmann-fold like core. The model ribbon is colored according to sequence conservation with the template structure PDB 2H00. Green: conserved, yellow: semi-conserved, white: non-conserved, red: no template structure available. The Rossmann-like fold harboring the SAM is well conserved, whereas the N-terminal region (gray helix at the bottom) and the modeled loop from approximately residues 189 to 221 with no template structure (red) must be considered tentative.

or 4-substituted tryptamines remains elusive. The PsiM crystal structure, preferably in complex with products, substrates, or analogues, will be necessary to accurately determine the actual origin of the functional specificity, including why 6-substituted tryptamines are not well processed by PsiM beyond the first methylation step.

For a first experimental validation of our structure model, we mutated the *psiM* gene to individually replace R75, D161, N183, Y187, S196, and H210 by an alanine residue. According to our model (Figure S7), four positions are located in the well-supported part of the model, with R75, N183, and Y187 being directly involved in SAM binding, although the contribution of solvent-exposed D161 to SAM binding was unclear. The engineered enzymes were heterologously produced as hexahistidine fusion proteins (Figure S8), purified, and tested for activity *in vitro*. Consistent with the model, the D161A variant was as active as the wild-type enzyme in *in vitro* assays. Variants R75A, N183A, and Y187A were catalytically inactive, as expected, most likely due to impaired SAM binding. Another two residues (S196 and H210) might also be involved in SAM binding, but are located in the loop region that, in the absence of a template, cannot be reliably modeled but that most likely confers methyl-acceptor specificity on PsiM. Variant S196A was inactive as well, perhaps as consequence of a destabilizing effect on the loop. Remarkably, H210A showed a near-normal first methylation of the standard substrate **3** into **2**, yet failed to perform the second methylation of **2** into **1** (Figure S9). Likewise, **6** was not detected in the *in vitro* reactions, whereas **8** was formed, albeit in low amounts. The reason for this shift in activity remains elusive but seems to underscore the relevance of the loop region for substrate recognition.

In conclusion, we have shown the enzymatic *in vitro* synthesis of the 6-methylated psilocybin congeners **6–8**. Indole methylation at carbon atom 6 does not cause consistent pharmacological effects. A study on 5-HT_{2B} receptor antagonists involving tetrahydro- β -carbolines showed that 6-methylation moderately impacted receptor binding and increased affinity eight-fold.^[17] In a series of synthetic chlorophenylethanol-substituted indolylalkylamine β_3 -adrenergic receptor agonists, indole methylation at C-6 did not alter affinity and led to comparable agonistic activity.^[18] Conversely, unlike its parental compound **5**, the 6-methylated analogue did not interact competitively with serotonin receptors.^[5c]

Compound **1** is a candidate drug to treat depression and is being investigated in clinical trials, and gram-scale production of **1** by chemical synthesis has been described, as well as production in submerged culture.^[19] Our future efforts are directed to a scale-up to provide sufficient **6** and **7** by biocatalytic means *in vitro* for comparative *in vivo* assays, in particular to discover agonistic or antagonistic effects on 5-HT receptors and, ultimately, for more profound insight into the pharmacology of serotonergic psychedelics.

Experimental Section

General procedures: Plasmid isolation, DNA restriction, and ligation followed the instructions of the manufacturers of kits and enzymes (NEB, Promega, Thermo, Zymo). Chemicals, media ingredients, and solvents were purchased from Becton–Dickinson, Key Organics, Roth, Sigma–Aldrich, THC Pharm, VWR, and Deutero. Oligonucleotides were synthesized by Microsynth.

Cloning of *S. cerevisiae* TRP5: *S. cerevisiae* BY4741 (Euroscarf) was grown in shaken liquid YPD medium (per liter: 10 g yeast extract, 20 g peptone, 20 g D-glucose). After harvest, total RNA was isolated by using the SV Total RNA isolation kit (Promega). Synthesis of the first cDNA strand was primed with an oligo-d(T)-primer and RevertAid reverse transcriptase. A subsequent PCR with oligonucleotide primers (0.2 μ M each) oJF127 (5'-TATAT AGCTA GCCAT GTCAG AACAA CTCAG-3', NheI site underlined) and oJF128 (5'-TATAT ACTCG AGTTA GGCAG ATGGG TC-3', XhoI site underlined) completed synthesis of the second strand. The PCR was set up with 0.2 mM each dNTP, 2 mM MgSO₄, in HF buffer that was supplied with the enzyme (Phusion DNA polymerase, 1 U). The PCR product was electrophoretically purified, subsequently extracted from an agarose gel, and ligated between the NheI and XhoI sites of pET28a, to create expression plasmid pJF56.

Mutation of PsiM: Site-directed mutagenesis of the *psiM* gene was accomplished by PCR amplifying the gene from pET28-based expression plasmid pFB13^[7d] as template. Each gene variant was amplified in two fragments that overlapped in the portion to be mutated. The 5'-end of fragment 1 and the 3'-end of fragment 2 overlapped with the polylinker of plasmid pET28a, linearized by BamHI and HindIII restriction enzymes. Plasmids were assembled with the NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit to yield constructs pJF71–76 for variants R75A, D161A, N183A, Y187A, S196A, and H210A, respectively. Primers for PCR amplifications of fragments 1 included forward oligonucleotide oJF161 and reverse oligonucleotides oJF163, oJF165, oJF167, oJF169, oJF171, or oJF173. Fragments 2 were amplified with reverse primer oJF162 and forward primers oJF164, oJF166, oJF168, oJF170, oJF172, or oJF174. Primer sequences are shown in Table S2.

Heterologous protein production and purification: All enzymes were produced in *Escherichia coli* KRX (Promega). *Psilocybe* enzymes TrpB, PsiD, PsiM, and PsiK were produced as described.^[7a,8] For heterologous production of *S. cerevisiae* TRP5, *E. coli* KRX transformed with pJF56 was used. Production of *E. coli* S-adenosylhomocysteine nucleosidase and adenine deaminase followed a described procedure.^[11b,12] The above enzymes were purified by immobilized metal-affinity chromatography on a His Trap FF Crude column (1 mL bed volume), fitted to an Äkta Pure 25 FPLC instrument (GE Healthcare). The system was equilibrated in loading buffer (50 mM sodium dihydrogen phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8). The column was washed by a step gradient of 30, 40, and 50 mM imidazole, using the same buffer. Elution was at 500 mM imidazole. The flow rate was 1 mL min⁻¹. For later use in assays, the eluted enzymes were rebuffed on PD-10 columns (GE Healthcare), equilibrated with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8.0). *S. enterica* tryptophan synthase was also produced in *E. coli* KRX, transformed with plasmid pSTB7, but enzymatic reactions were run with the cell lysate.^[10] The biomass from a 500 mL culture was harvested by centrifugation (1200g, 4 °C, 20 min), and the cell paste was resuspended in sonication buffer (7 mL, 500 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 100 μ M PLP, pH 7.8), sonicated, and centrifuged again (14000g, 4 °C, 20 min) to remove cell debris. For subsequent reactions (below), 100 μ L of the supernatant containing cell lysate was used. For size-exclusion chromatography with intact and heat-treated PsiM, samples were loaded onto a Superdex 200 column and eluted with 10 mM phosphate buffer with 140 mM NaCl.

Enzyme assays: All reactions were carried out in triplicate. *In vitro* tryptophan synthase assays with *P. cubensis* TrpB were carried out as described.^[8] Reactions with TRP5 (1 μ M) were run in a volume of 500 μ L and buffered in Tris-HCl (50 mM, pH 8.0). L-Serine and **10** (or indole in the positive control) were added at 1 mM each, PLP at 100 μ M final concentration. The assay mixtures were incubated over night at room temperature (37 °C for the *S. enterica* enzyme), lyophilized, resuspended in methanol (200 μ L), filtered, and chromatographically analyzed (below). The assays with the *S. enterica* enzyme were run identically, but with cell lysate. To prepare **9** in a scaled-up reaction, the procedure by Goss and Newill was applied.^[10]

The triple-enzyme assay (PsiD/PsiK/PsiM) was buffered in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and incubated at ambient temperature for 4 h. It contained ATP, MgCl₂, and SAM (2 mM each), **9** (1 mM), and enzyme (1 μ M each). The total volume was 300 μ L. A separate assay was set up with SAM (2 mM), **7** (1 mM), PsiM (1 μ M), and *E. coli* adenine deaminase and SAH nucleosidase (1 μ M each). To prepare **8** for NMR-based structure elucidation, a combined PsiD/PsiK assay (1 μ M each enzyme, phosphate buffer, pH 7.5, 4 h, room temperature) was carried out that contained ATP and MgCl₂ (2 mM each), and **9** (1 mM) in a volume of 30 mL. Product **7** was purified chromatographically (below). To complete production of **8**, a subsequent separate reaction was run (1 mM) PsiM, Tris-HCl buffer, pH 8.0, for 4 h, room temperature) that contained SAM (2 mM) and **7** (1 mM) in a volume of 30 mL. Reactions were stopped by freezing, and the mixtures subsequently lyophilized, solved in 200 μ L MeOH (50 mL in case of preparative assays to produce **8**), centrifuged (14000g, 4 °C, 10 min), and filtered to prepare them for chromatography (below).

Chemical analysis of enzyme assays: All UHPLC/ESIMS analyses of *in vitro* assays were performed on an Agilent Infinity 1290 chromatograph with a Phenomenex Luna Omega C₁₈ column (100 \times 2.1 mm, 1.6 μ m particle size, flow: 0.5 mL min⁻¹), coupled to an Agi-

lent 6130 Single Quadrupole mass detector. Diode array detection was between $\lambda = 200$ –400 nm. Chromatograms were extracted at $\lambda = 280$ nm. Solvent A was 0.1% (v/v) formic acid in H₂O, solvent B was acetonitrile (ACN). The linear gradient was 1→10% B over 3 min, then →100% B over 1 min. LC/HRESIMS, and MS/MS analyses with purified substances were performed on a Thermo Accela chromatograph coupled to an Exactive Orbitrap mass spectrometer, as described.^[7a]

Chromatographic purification of compounds: Compounds **6–9** were purified by preparative HPLC on an Agilent 1260 series preparative instrument equipped with a Zorbax Eclipse XDB C₈ column (250×21.2 mm, 10 μ m). Solvent A was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, solvent B was ACN. A linear gradient of 5→100% B over 20 min at a flow of 20 mL min⁻¹ was applied. Further workup of **6–8** included chromatography on an Agilent 1260 series analytical/semipreparative instrument equipped with a ThermoFischer Hypercarb column (150×10 mm, 5 μ m, flow: 3 mL min⁻¹). Solvent A was 0.1% (v/v) TFA in H₂O, solvent B was ACN. The gradient included an initial hold at 10% B for 1 min, linear increase to 30% B over 1 min, to 60% B over 9 min, and to 100% B over 0.5 min. Final purification was accomplished on a Phenomenex Synergi Polar-RP column (150×4.6 mm, 4 μ m, flow: 1.5 mL min⁻¹). The gradient was linear increase 1→10% B over 9 min, and to 100% B over 0.5 min.

NMR spectroscopy: 1D and 2D NMR spectra of **8** were recorded at 300 K on a Bruker Avance III spectrometer at 600 MHz in [D₆]DMSO. Chemical shifts were referenced to residual non-deuterated solvent ($\delta_H = 2.50$ ppm and $\delta_C = 39.5$ ppm).

In silico modeling of PsiM: Homology modeling of PsiM and fully flexible ligand docking of SAM was undertaken in ICM-Pro desktop modeling package v3.8-7b (MolSoft LLC), based on the Internal Coordinates (IC) representation of molecular objects.^[20] After initial placement of the aligned polypeptide chain onto the template structure, side-chain torsion angles were predicted by simultaneous global optimization of the energy for all non-identical residues. The conformational modeling of the protein side chains and loops was then refined by using the Biased Probability Monte Carlo (BPMC) optimization method.^[21] The SAM binding pocket was prepared for ligand docking,^[22] and the ligand was docked by using ICM-Pro.

Acknowledgements

We thank Andrew Perner and Heike Heinecke (Hans-Knöll-Institute Jena), and Florian Baldeweg (Friedrich-Schiller-University, Jena) for recording high-resolution mass and NMR spectra, and for additional interpretation of NMR data, respectively. We are grateful to Professor Dr. Florian P. Seebeck (University of Basel) for expression plasmids to produce S-adenosylhomocysteine nucleosidase and adenine deaminase. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant HO2515/7-1 to D.H.) and by the Usona Institute (Madison, WI). D.H. is also supported by the DFG Collaborative Research Center ChemBioSys 1127. B.R. and A.N. receive partial funding from the Austrian Science Fund (FWF) under project P 28395-B26.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: baeocystin • biosynthesis • enzymes • methyltransferase • psilocybin

- [1] a) A. Hofmann, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Experientia* **1958**, *14*, 397–399; b) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572; c) A. Y. Leung, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1667–1671.
- [2] a) D. E. Nichols, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *101*, 131–181; b) F. Hasler, U. Grimberg, M. A. Benz, T. Huber, F. X. Vollenweider, *Psychopharmacology* **2004**, *172*, 145–156.
- [3] a) C. S. Grob, A. L. Danforth, G. S. Chopra, M. Hagerty, C. R. McKay, A. L. Halberstadt, G. R. Greer, *Arch. Gen. Psychiatry* **2011**, *68*, 71–78; b) M. W. Johnson, A. Garcia-Romeu, M. P. Cosimano, R. R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2014**, *28*, 983–992; c) A. Mahapatra, R. Gupta, *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **2017**, *7*, 54–56; d) A. M. Sherwood, T. E. Prisinzano, *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 1–3.
- [4] a) F. Troxler, F. Seemann, A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2073–2103; b) A. Cerletti, M. Taeschler, H. Weidmann, *Adv. Pharmacol.* **1968**, *6*, 233–246.
- [5] a) F. Yamada, M. Tamura, A. Hasegawa, M. Somei, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 92–99; b) D. B. Repke, W. J. Ferguson, D. K. Bates, *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18*, 175–179; c) R. A. Glennon, E. Schubert, J. M. Jacyno, *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1222–1226.
- [6] A. T. Shulgin, A. Shulgin, *Tihkal: The Continuation*, Transform Press, Berkeley, **1997**.
- [7] a) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12352–12355; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524–12527; b) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524–12527; c) H. T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H. B. Korotkin, P. B. Matheny, J. C. Slot, *Evol. Lett.* **2018**, *2*, 88–101; d) J. Fricke, C. Lenz, J. Wick, F. Blei, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 897–903.
- [8] F. Blei, F. Baldeweg, J. Fricke, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10028–10031.
- [9] H. Zalkin, C. Yanofsky, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1491–1500.
- [10] R. J. Goss, P. L. Newill, *Chem. Commun.* **2006**, *47*, 4924–4925.
- [11] a) A. Vit, L. Misson, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 119–125; b) L. Misson, R. Burn, A. Vit, J. Hildesheim, M. A. Beliaeva, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1333–1342.
- [12] F. Blei, J. Fricke, J. Wick, J. C. Slot, D. Hoffmeister, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 2160–2166.
- [13] B. P. S. Chouhan, S. Maimaiti, M. Gade, P. Laurino, *Biochemistry* **2019**, *58*, 166–170.
- [14] H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 329–335.
- [15] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumieny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303.
- [16] J. R. Min, H. Wu, H. Zeng, P. Loppnau, J. Weigelt, M. Sundstrom, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, A. Bochkarev, A. N. Plotnikov, Structural Genomics Consortium, PDB ID: 2H00, **2006**.
- [17] J. E. Audia, D. A. Evrard, G. R. Murdoch, J. J. Droste, J. S. Nissen, K. W. Schenck, P. Fludzinski, V. L. Lucaites, D. L. Nelson, M. L. Cohen, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2773–2780.
- [18] H. Harada, Y. Hirokawa, K. Suzuki, Y. Hiya, M. Oue, H. Kawashima, N. Yoshida, Y. Furutani, S. Kato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1301–1305.
- [19] a) O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 885–887; b) D. E. Nichols, S. Frescas, *Synthesis* **1999**, *6*, 935–938; c) J. Gartz, *J. Basic Microbiol.* **1989**, *29*, 347–352; d) P. Catalfomo, V. E. Tyler, *Lloydia* **1964**, *27*, 53–63.
- [20] R. Abagyan, M. Totrov, D. Kuznetsov, *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 488–506.
- [21] R. Abagyan, M. Totrov, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 983–1002.
- [22] A. J. W. Orr, R. Abagyan in *Homology Modeling: Methods and Protocols* (Eds.: A. J. W. Orr, R. Abagyan), Humana, Totowa, **2012**, pp. 351–373.

Manuscript received: May 31, 2019

Accepted manuscript online: May 31, 2019

Version of record online: October 17, 2019

Supporting Information

Enzymatic Route toward 6-Methylated Baeocystin and Psilocybin

Janis Fricke,^[a] Alexander Sherwood,^[b] Robert Kargbo,^[b] Andrew Orry,^[c] Felix Blei,^[a]
Andreas Naschberger,^[d] Bernhard Rupp,^[d, e] and Dirk Hoffmeister^{*,[a]}

cbic_201900358_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of Contents

Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of TRP5.....	2
Figure S2. MS/MS analysis of enzymatic products	3
Figure S3. ¹ H NMR spectrum of 6-methylbaecystin (8)	4
Figure S4. ¹ H, ¹ H COSY spectrum of 6-methylbaecystin (8)	5
Figure S5. Size exclusion chromatography of PsiM	6
Figure S6. Alignment of methyltransferase sequences	7
Figure S7. SAM binding site of the <i>Psilocybe cubensis</i> PsiM model	8
Figure S8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of PsiM	9
Figure S9. Relative Activities of PsiM variants.....	10
Table S1. Retention times and masses of enzymatic products.....	11
Table S2. Oligonucleotide primers.....	11

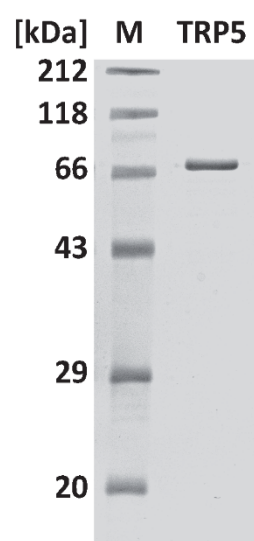


Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinantly produced and purified hexahistidine-tagged *Saccharomyces cerevisiae* tryptophan synthase TRP5. M: Molecular weight marker, sizes are indicated.

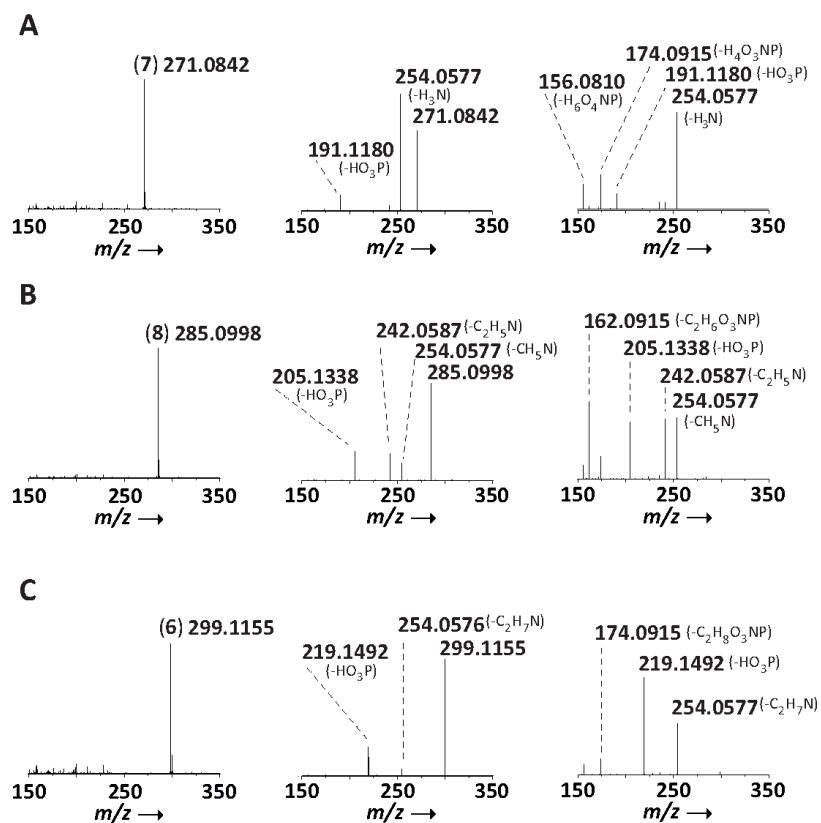


Figure S2. Tandem MS/MS analysis of indole alkaloids. Left panels: MS spectra of parent compounds, center and right panels: MS/MS spectra with 20% and 40% of the total ionization energy, respectively. A: spectra of 6-methylnorbaeocystin (**7**), B: 6-methylbaeocystin (**8**), and C: of 6-methylpsilocybin (**6**).

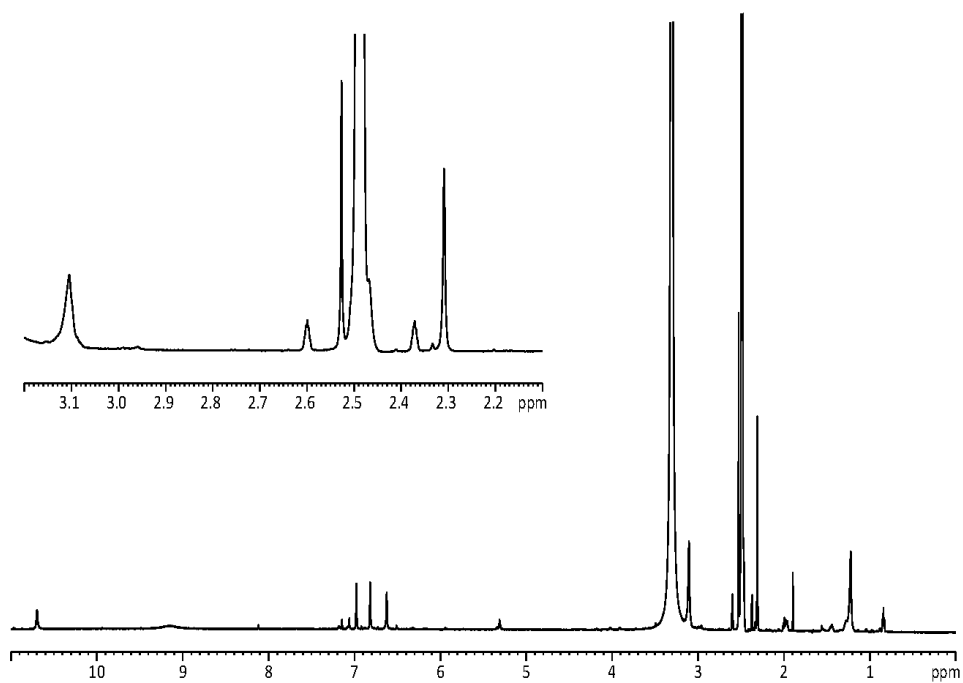


Figure S3. ¹H NMR spectrum (600 MHz, recorded in DMSO-*d*₆ at 300 K) of 6-methylbaecocystin (**8**), partially purified from an enzymatic assay.

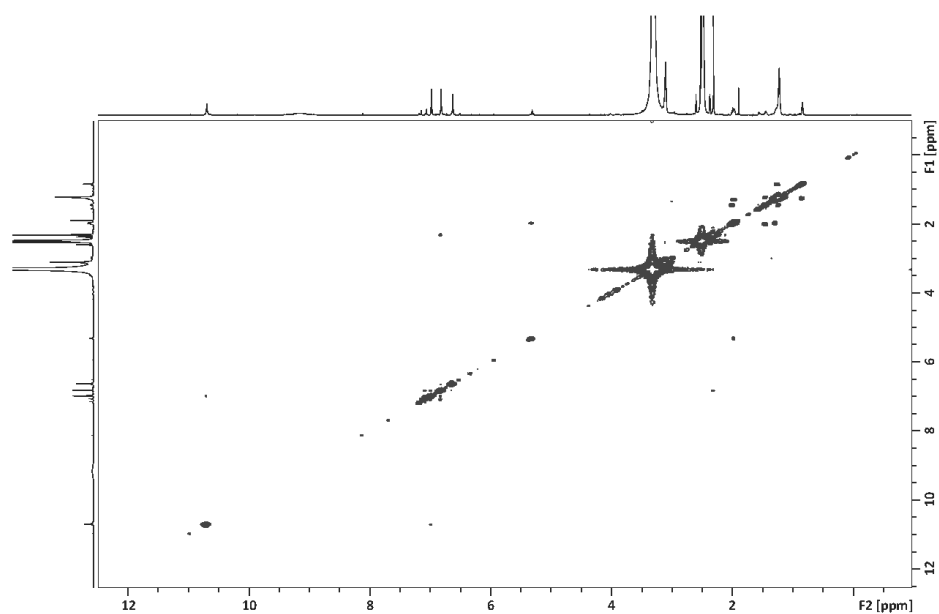


Figure S4. $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY spectrum (600 MHz, recorded in $\text{DMSO}-d_6$ at 300 K) of 6-methylbaecocystin (**8**), partially purified from an enzymatic assay.

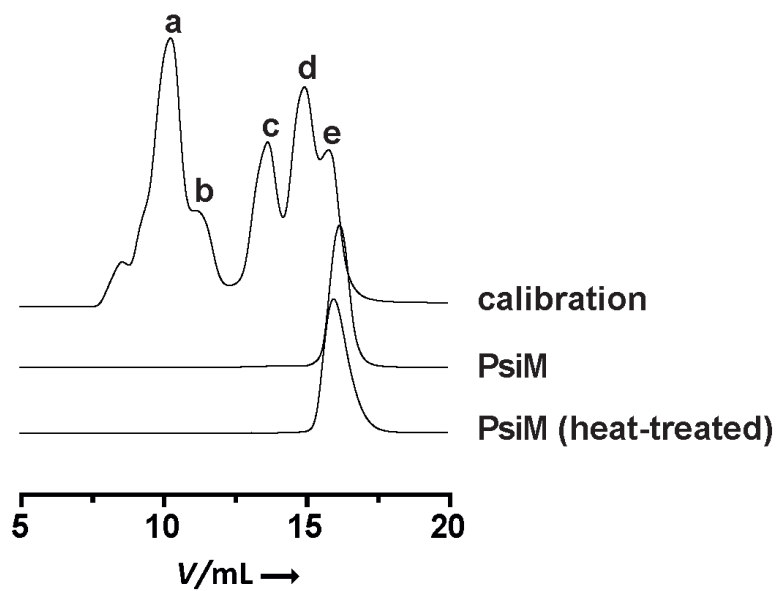


Figure S5. Size exclusion chromatography of untreated and heat-denatured PsiM enzyme. Signals in the calibration track correspond to 669 kDa (a, thyroglobulin), 440 kDa (b, ferritin), 158 kDa (c, aldolase), 75 kDa (d, conalbumin), and 44 kDa (e, ovalbumin). Both heat-treated and untreated, active PsiM elute at 16 mL, which corresponds to ca. 37 kDa (calculated for hexahistidine-tagged PsiM: 37.6 kDa) and demonstrates that PsiM is monomeric in its active form.

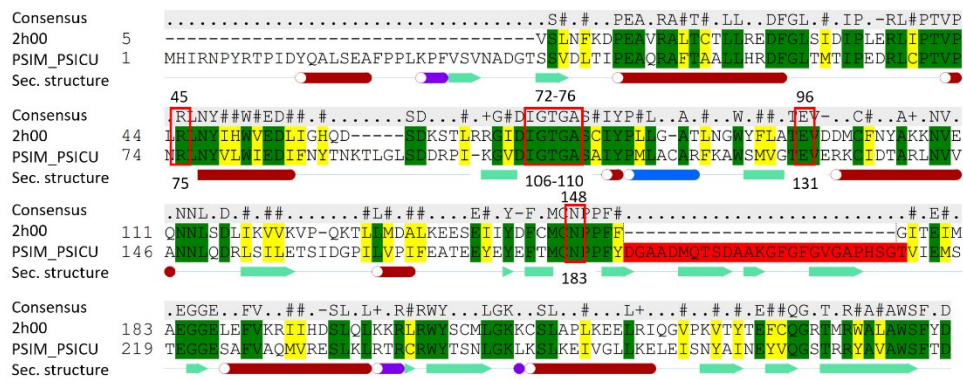


Figure S6. Sequence alignment of *Psilocybe cubensis* PsiM (PSIM_PSICU) with the human methyltransferase 10 domain containing protein METTL16 (template structure 2h00). The sequence alignment is colored according to sequence conservation (green: conserved, yellow: semi-conserved, white: non-conserved, red insertion: no template structure). The secondary structure is represented by colored arrows and cylinders (red = alpha helix, green = beta sheet, blue = pi helix, magenta = 3/10 helix). Red boxes annotate the xGxGx motif, the ribose contact E 96/131, and carboxyl group anchors R 45/75 and N148/183 conserved in class I methyltransferases.

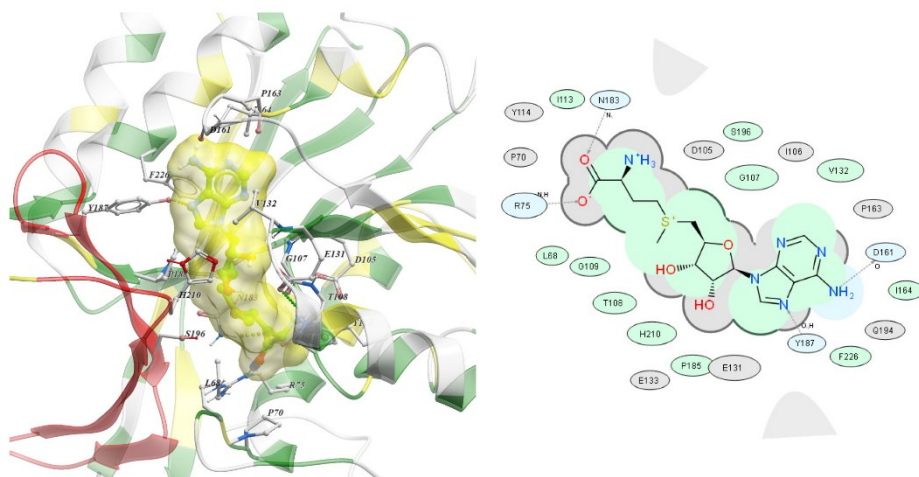


Figure S7. SAM binding site of the *Psilocybe cubensis* PsiM homology model. The left panel shows the SAM in ball and stick representation docked in the binding cleft of the homology model with the methyl-donating leaving group on the sulfur atom pointing out of the SAM binding site into the lumen accessible to the substrates. Key residues are labeled and shown in ball and stick representation. The loop region displayed in red could not be reliably modeled in absence of a template and interactions with its residues such as H210 remain tentative. Right panel: 2D-representation of key residues involved in the interaction of PsiM and SAM, including the contacts to the glycine-rich conserved xGxGx (IGTGA 106-110). The ribose is restrained by a polar interaction with the conserved ribose contact E131, and the SAM carboxyl is anchored by a salt bridge to the conserved R75 and by a hydrogen bond to N183. Multiple hydrophobic contacts line the binding cleft. Key to the scheme: The size of residue ellipse represents the strength of the respective contact: Green shading represents hydrophobic contact; blue shading represents hydrogen bond with arrows representing direction; grey parabolas represent large accessible surface areas. The thick line around the ligand shape indicates the accessible surface. The 2D distance between a residue label and the ligand represents their 3D proximity. The figure was generated with MolSoft ICM Pro.

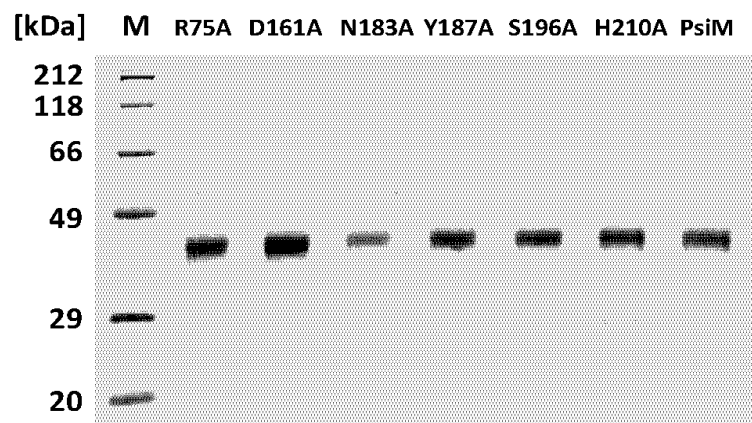


Figure S8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinantly produced hexahistidine-tagged *Psilocybe cubensis* methyltransferases PsiM and engineered variants R75A, D161A, N183A, Y187A, S196A, and H210A.

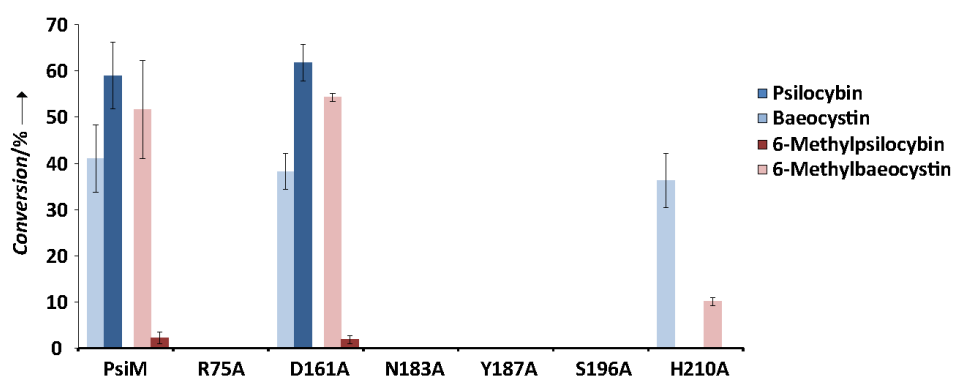


Figure S9. Relative activities of engineered PsiM methyltransferase variants R75A, D161A, N183A, Y187A, S196A, and H210A, referenced to the wild type enzyme. Conversion of substrates into products was calculated based on the areas under curves of the respective ion chromatograms.

Table S1. Retention times (t_R) and masses (m/z) of enzymatic products and authentic standards.

compound	t_R [min] ^[a]	m/z (found) ^[b]	m/z (calculated) ^[b]	sum formula ^[b]
6-methyl-4-hydroxy-L-tryptophan (9)	3.8	235.1077	235.1077	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃
6-methylnorbaeocystin (7)	1.5	271.0842	271.0842	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₄ P
6-methylbaeocystin (8)	2.1	285.0998	285.0999	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₄ P
6-methylpsilocybin (6)	2.8	299.1153	299.1155	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₄ P
psilocybin (1)	1.4	285.0997	285.0999	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₄ P
baeocystin (2)	0.9	271.0840	271.0842	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₄ P

^[a] using the analytical conditions described in the Experimental Section^[b] for $[M+H]^+$ **Table S2.** Oligonucleotide primer pairs used to engineer the *psiM* gene. Underlined bases indicate introduced mutations.

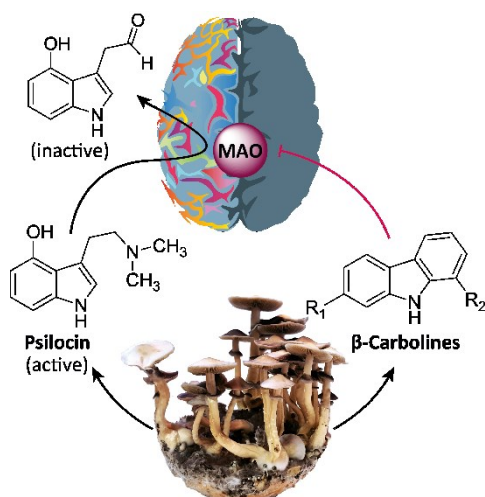
Forward primer	Reverse primer	Sequence	PsiM variant	Plasmid
oJF161	oJF162	CTCGAGTGC GGCCGCAAG CAGCAAATGGGTCGCGGATC		
oJF164	oJF163	CAGTCCCCAATGCGTTGA ACTAC GTAGTTCAACGCATTGGGGACTG	R75A	pJF71
oJF166	oJF165	GACATCCATTGCTGGTCCTATTC GAATAGGACCAGCAATGGATGTC	D161A	pJF72
oJF168	oJF167	GTTTACTATGTGTGCCCTCCATTC GAATGGAGGGGCACACATAGTAAAC	N183A	pJF73
oJF170	oJF169	CCCTCCATTCCGCGACGGTGCTG CAGCACCCTCGGC GAATGGAGGG	Y187A	pJF74
oJF172	oJF171	GATATGCAGACTGCGGATGCTGC GCAGCATCCGCAGTCTGCATATC	S196A	pJF75
oJF174	oJF173	GCGCTCCCGCTTCTGGAACAG CTGTTCCAGAA GCGGGAGCGC	H210A	pJF76

3.5 Simultaneous production of psilocybin and β -carboline monoamine oxidase inhibitors in 'magic mushrooms'

Felix Blei*, Sebastian Dörner*, Janis Fricke, Florian Baldeweg, Felix Trottmann, Anna Komor, Florian Meyer, Christian Hertweck, Dirk Hoffmeister

Chemistry - A European Journal, Band 26, Ausgabe 3, Seiten 729-734, 2020

Zusammenfassung



Die psychotropen Effekte der sogenannten Magic Mushrooms werden durch die Prodrug Psilocybin verursacht. Abgesehen von diesem Wirkstoff ist das Metabolom von Pilzen der Gattung *Psilocybe* noch weitgehend unerforscht. Die Analyse von vier *Psilocybe*-Arten identifizierte erstmals Harman, Harmin und weitere L-Tryptophan abhängige β -Carboline aus Pilzen. Die Substanzen wurden per 1D- und 2D-NMR bestätigt und mittels Einbau von isotoopenmarkierten

$^{13}\text{C}_{11}$ -L-Tryptophan als Biosynthese-Produkte der Pilze identifiziert. Durch MALDI-MS zeigte sich, dass die β -Carboline in den Hyphenspitzen akkumulierten. Die Ergebnisse sind insofern relevant, da β -Carboline sich als starke Inhibitoren der Monoamine Oxidase herausgestellt haben und somit Einfluss auf den Abbau des Psilocybins haben. Die β -Carboline haben eine synergistische Wirkung zum Psilocybin und tragen indirekt oder direkt zur pharmakologischen Wirkung der *Psilocybe* Pilze bei.

Angaben zum Eigenanteil: 30 %

Kultivierung und Extraktion von diversen *Psilocybe* sp. -Fruchtkörpern und -Mycelien, Identifikation der β -Carboline in den Extrakten mittels z.B. Dünnschichtchromatografie, Analyse der Proben per HPLC, Aufreinigung von Harman und Harmin mittels präparativer und semipräparativer HPLC für NMR-spektroskopische Untersuchungen, Mitarbeit am Manuskript

***= Beide Autoren haben im gleichen Umfang zur Arbeit beigetragen.**

Jena, den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

■ Natural Products | Hot Paper |

Simultaneous Production of Psilocybin and a Cocktail of β -Carboline Monoamine Oxidase Inhibitors in “Magic” Mushrooms

Felix Blei,^[a] Sebastian Dörner,^[a] Janis Fricke,^[a] Florian Baldeweg,^[a] Felix Trottmann,^[b]
Anna Komor,^[b] Florian Meyer,^[c] Christian Hertweck,^[b, d] and Dirk Hoffmeister^{*[a]}

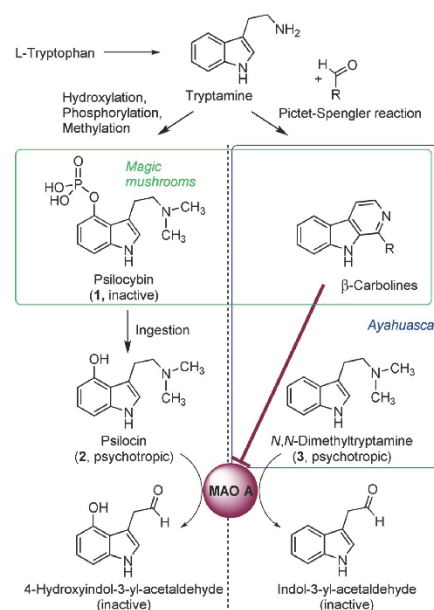
Abstract: The psychotropic effects of *Psilocybe* “magic” mushrooms are caused by the L-tryptophan-derived alkaloid psilocybin. Despite their significance, the secondary metabolome of these fungi is poorly understood in general. Our analysis of four *Psilocybe* species identified harmaline, harmine, and a range of other L-tryptophan-derived β -carboline as their natural products, which was confirmed by 1D and 2D NMR spectroscopy. Stable-isotope labeling with ¹³C₁₁-L-tryptophan verified the β -carbolines as biosynthetic

products of these fungi. In addition, MALDI-MS imaging showed that β -carbolines accumulate toward the hyphal apices. As potent inhibitors of monoamine oxidases, β -carbolines are neuroactive compounds and interfere with psilocybin degradation. Therefore, our findings represent an unprecedented scenario of natural product pathways that diverge from the same building block and produce dissimilar compounds, yet contribute directly or indirectly to the same pharmacological effects.

Introduction

Since ancient times, vision-inducing, consciousness-altering natural products, so-called entheogens, have been used for spiritual purposes. The producing plants or fungi have accompanied humankind and impacted the genesis of culture and religion.^[1] Indisputably, mushrooms producing psilocybin (1, Scheme 1) rank among the most prominent entheogens and were considered the “flesh of the gods” (teonanacatl) by the Aztecs.^[1] Numerous species within the fungal genus *Psilocybe* and other genera biosynthesize **1** which represents the phos-

phorylated prodrug to the psychotropic agent psilocin (2),^[2] first described by Albert Hofmann and co-workers sixty years ago.^[3] Subsequently, N-methylated L-tryptophan as well as indoleethylamines, i.e., the intermediates of **1** baeocystin, nor-



Scheme 1. Schematic overview on psychoactive principles of *Psilocybe* mushrooms (green) and ayahuasca (blue), their biosynthetic origin, and their inactivation in the human body by monoamine oxidase (MAO) A.

[a] F. Blei,[†] S. Dörner, J. Fricke, Dr. F. Baldeweg, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmaceutical Microbiology, Hans Knöll Institute
Friedrich Schiller University, Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

[b] F. Trottmann, Dr. A. Komor, Prof. Dr. C. Hertweck
Department Biomolecular Chemistry, Leibniz Institute for Natural
Product Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)

[c] Dr. F. Meyer
Transfer Group Anti-Infectives, Leibniz Institute for Natural Product
Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)

[d] Prof. Dr. C. Hertweck
Faculty of Biological Sciences, Friedrich Schiller University
Jena, 07745 Jena (Germany)

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the
author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/chem.201904363>.

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
This is an open access article under the terms of Creative Commons Attribution NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

baeocystin, and norpsilocin were discovered.^[4] Compound **2** interferes with serotonergic neurotransmission because it acts as a partial agonist primarily on the 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A}-receptor.^[5] The perceptual and somatic effects include synesthesia, visual hallucinations, dilated pupils, and others.^[6] The effects last for several hours before they subside when **2** is eliminated both renally through O-glucuronylation and by formation of 4-hydroxyindol-3-yl-acetaldehyde (Scheme 1). The latter process is catalyzed by the monoamine oxidase isozyme A (MAO A),^[7] a mitochondrial flavin-dependent enzyme that oxidatively deaminates serotonin and other biogenic and neuroactive amines. Consequently, MAO inhibitors generally increase the pharmacological effects of such bioactive amines.

Another entheogen that has traditionally been consumed in spiritual and healing ceremonies is a psychotropic brew, known by its vernacular name ayahuasca, a Quechua term literally meaning “vine of the souls”. Unlike *Psilocybe* mushrooms, it is not the product of a single biological species. Rather, ayahuasca consists of leaves of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT, **3**, Scheme 1) producers, e.g., *Psychotria viridis* (Rubiaceae, coffee family).^[9] Compound **3** is inactive when taken up orally, but becomes neuroactive in the presence of MAO A inhibitors that prevent **3** degradation in the human gut (Scheme 1). Such inhibitors are present in ayahuasca as well, because its second ingredient is the bark of the jungle vine *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), which produces β -carbolines, which are strong reversible MAO inhibitors.^[8] Ayahuasca’s synergism, caused by two separate species, has empirically been discovered in pre-Columbian times by South American natives.^[9] It compensates the fact that synchronous production of a bioactive compound and the inhibitor of its own degradation as enhancer in one single species is unprecedented for psychotropic natural products.

Besides **1** and its congeners, other amino-acid derived natural products have not been reported yet from *Psilocybe* mushrooms. Therefore, their secondary metabolomes appear surprisingly little understood, despite 60 years of intensive research. We addressed this knowledge gap and describe here an in-depth re-analysis of natural-product profiles of five *Psilocybe* species. In all of them, we identified β -carbolines as their products, i.e., a metabolic profile reminiscent of the active principles of ayahuasca.

Results and Discussion

In the course of metabolic profiling of carpophores of *Psilocybe mexicana*, we routinely extracted with methanol, using a published protocol,^[4c] and analyzed the crude extracts by LC-HR-ESI-MS. As expected, **1**, its immediate biosynthetic precursors baeocystin and norbaeocystin, and low amounts of its dephosphorylated follow-up compound **2** were detected. However, we also identified two very minor mass spectrometric signals that showed retention times and masses dissimilar to those of authentic standards of **1** and its precursors (Figure 1A). These signals appeared at $t_R = 4.53$ min ($m/z = 183.0916$ [$M+H$]⁺) and at $t_R = 4.89$ min ($m/z = 213.1025$ [$M+H$]⁺). We hypothesized that β -carbolines may account for these signals as the ob-

served masses are in good agreement with that of harmine (**4**, Figure 1) and harmine (**5**).^[10] Upon exposure to UV light, β -carbolines fluoresce.^[11] Therefore, we repeated the analysis, this time using an acidic aqueous mushroom extract and an HPLC instrument interfaced to a fluorescence detector, excitation was at $\lambda = 340$ nm, emission was recorded at $\lambda = 410$ nm. The signals were detected again, and authentic **4** and **5** standards showed identical retention times and masses (Figure 1B).

We analyzed acidic aqueous extracts of other *Psilocybe* species by HPLC and fluorescence detection (Figure 1C) to investigate if β -carbolines were present in those fungi as well. Compound **4** and, in lower quantities, **5** were found ($t_R = 2.98$ and 3.16 min) in carpophores of *P. cyanescens*, *P. semilanceata*, and of two *P. cubensis* isolates, as well as in *P. mexicana* (both sclerotia and mycelium), and in *P. cubensis* mycelium. In addition to the above-mentioned β -carbolines, we detected norharmine (**6**, $t_R = 2.85$ min, Figure 1) and perlopyrine (**7**, $t_R = 3.49$ min), and identified them by their masses ($m/z = 169.0763$ and 265.0974 [$M+H$]⁺) and by comparison with synthetic standards. The latter compound is known as a plant alkaloid from *Codonopsis pilosula* (Campanulaceae, bellflower family).^[12] Overall, the β -carboline pattern was quantitatively and qualitatively inhomogeneous among species, yet indicated that their occurrence is i) more widespread within the genus *Psilocybe* and ii) independent of the developmental stage. For final evidence that *Psilocybe* fungi contain β -carbolines, we purified the two major compounds from *P. cubensis* carpophores. Subsequent 1D and 2D NMR spectroscopy resulted in spectra (Figures S1–S10, Table S1, Supporting Information) that were identical to reported data for **4** and **5**.^[13]

Biosynthetically, β -carbolines derive from tryptamine and have been isolated from plants, bacteria, and various fungi including basidiomycetes.^[10,14] To confirm that the compounds are intrinsic *Psilocybe* products, we carried out stable-isotope labeling with ¹³C₁₁-L-tryptophan and *P. mexicana* mycelium in liquid axenic culture under controlled laboratory conditions, along with an unlabeled control, and detected **4**, **6**, and **7** again. In the stable-isotope-treated cultures, the masses of the carbolines expectedly increased by ten mass units (Figure 2). This is compatible with the incorporation of ten ¹³C atoms, i.e., a ¹³C₁₀-tryptamine moiety. Thus, we had excluded a carboline source other than *Psilocybe*’s intrinsic cellular metabolism.

We detected two further compounds in minor quantities. The first one whose mass was identical to that of harmol (**8**, $m/z = 199.0869$ [$M+H$]⁺) was eluted at $t_R = 4.26$ min. However, authentic **8** showed a shorter retention time ($t_R = 3.99$ min, Figure 2), which points to an isomer of **8** as *Psilocybe* metabolite. *P. mexicana* mycelium also contained a compound at $t_R = 4.89$ min ($m/z = 213.1025$ [$M+H$]⁺). Even though this molecular mass is identical to that of **5**, the retention time was not, as this unidentified compound virtually co-eluted with **4** at $t_R = 4.53$ min.

This mass is consistent with that of cordysinins C and D (**9** and **10**), i.e., enantiomeric β -carbolines described from the caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis*.^[15] Comparison with a synthesized mixture of **9** and **10** confirmed that one of those compounds, or both, is a *P. mexicana* metabolite as well.

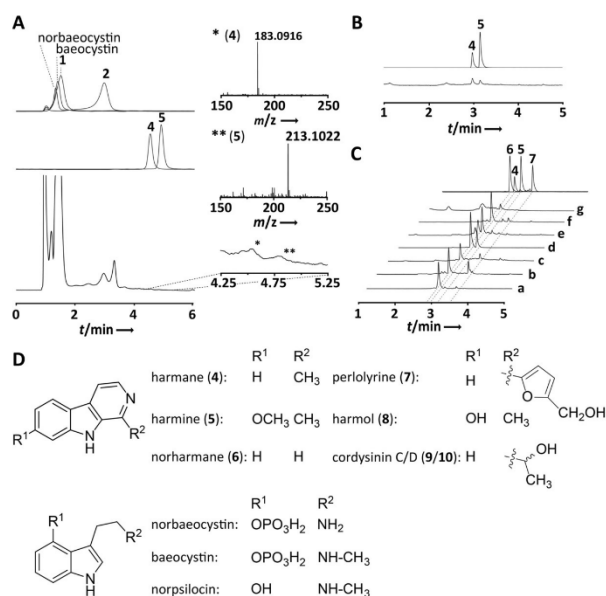


Figure 1. A) Chromatography of methanolic *P. mexicana* extracts. Top trace: overlaid extracted ion chromatogram (mass tolerance = 0.1 ppm) for the masses of norbaeocystin ($m/z = 257.0680$ [$M+H$]⁺, $t_R = 1.33$ min), baecocystin ($m/z = 271.0836$ [$M+H$]⁺, $t_R = 1.43$ min), psilocybin (1, $m/z = 285.0992$ [$M+H$]⁺, $t_R = 1.53$ min), and psilocin (2, $m/z = 205.1333$ [$M+H$]⁺, $t_R = 3.01$ min). Below, extracted ion chromatograms for the masses of harmine (4, $m/z = 183.0916$ [$M+H$]⁺) and harmine (5, $m/z = 213.1022$ [$M+H$]⁺). Bottom: UV/Vis chromatogram (recorded at $\lambda = 300$ nm, portion from 4.25–5.25 min expanded) and mass spectra. B) HPLC analysis with fluorescence detection. Upper trace: overlaid chromatograms of authentic 4 and 5, lower trace: acidic aqueous *P. mexicana* mushroom extract. C) HPLC analysis with fluorescence detection. Upper trace: overlaid chromatograms of authentic 4–7, traces a–d: carpophores of *P. cyanescens*, *P. cubensis* FSU12410, *P. cubensis* FSU12407, and *P. semilanceata*, respectively. Trace e: *P. mexicana* sclerotia, traces f and g: *P. mexicana* and *P. cubensis* mycelium. D) Chemical structures of β -carbolines identified as *Psilocybe* natural products during this study, and of known *Psilocybe* indole alkaloids baecocystin, norbaecocystin, and norpsilocin.

P. cubensis FSU12410 mycelia and carpophores were used to quantify the concentration of 4, i.e., the major β -carboline in the fungal biomass (Figure 1C, Table S2, Supporting Information). Although mycelia showed a concentration of $21 \mu\text{g g}^{-1}$ dried biomass, we found a 100-fold lower concentration in the carpophores ($0.2 \mu\text{g g}^{-1}$). Sclerotia of *P. mexicana* contained $1.4 \mu\text{g g}^{-1}$ 4 and $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$ 5. Next, we used MALDI imaging to investigate the spatial distribution of 4 in fungal mycelium. An actively growing *P. cubensis* culture was screened for a compound with $m/z = 183.1 (\pm 0.7)$ Da, which corresponds to 4 (Figure 3). The signals of maximum intensity localized to the hyphal tips while more mature areas showed low abundance.

Considered divine by native Central Americans, *Psilocybe* mushrooms produce 1, a natural product that has been used both as recreational drug and an immensely valuable candidate pharmaceutical, currently in advanced clinical trials, to treat anxiety and depression.^[16] Despite their history and importance, the mushrooms' capacity to make further compounds has received deceptively little attention. We identified five *Psilocybe* species as β -carboline producers. This capacity of 1-producing mushrooms is remarkable in the light of the synergistic pharmacology. 4 and 5 are potent reversible inhibitors of mammalian brain and liver MAO A ($K_i = 8.9$ and 0.5 nM, for

brain, $K_i = 9.9$ and 0.2 nM for liver).^[17] Human placental MAO A is inhibited at $K_i = 7.2 \mu\text{M}$.^[18] Furthermore, tetrahydro- β -carbolines do not inhibit MAO A, yet represent neuroactive natural products as well as they moderately inhibit serotonin reuptake.^[19]

Conclusions

Psilocybe mushrooms produce an ayahuasca-like and potentially similarly synergistic set of metabolites that may impact upon onset and duration of their effects. Remarkably, both pathways originate from the same generic building block, L-tryptophan, yet take different routes leading to dissimilar compounds whose bioactivities in return contribute directly and indirectly to the same pharmacology (Scheme 1). This is a unique case in fungal chemistry and distantly related to the bacterium *Streptomyces clavuligerus* that synchronously produces both the β -lactam antibiotic cephamycin and the β -lactamase inhibitor clavulanic acid.^[20]

Despite the co-occurrence of 1 and MAO inhibitors in *Psilocybe*, numerous studies with pure synthetic compound have shown that the somatic, endocrinic, and psychotropic effects are the sole consequence of 1 uptake.^[21] Future pharmacologi-

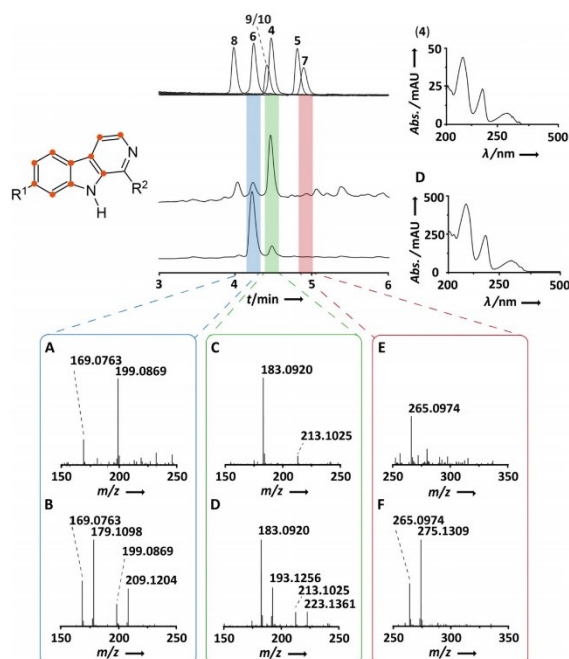


Figure 2. LC-MS analysis of *P. mexicana* mycelial extracts after ^{13}C stable-isotope labeling. The generic labeling pattern is shown by red carbon atoms. UHPLC chromatograms were recorded at $\lambda = 300\text{ nm}$. Top trace: overlaid chromatograms of standards 4–10. Center trace: culture grown with unlabeled L-tryptophan (control). Bottom trace: culture grown in the presence of $^{13}\text{C}_{11}$ -L-tryptophan. Below, HR-ESI-MS spectra are shown. Blue: spectra for $t_R = 4.26\text{--}4.28\text{ min}$ with coeluting 6 and the isomer of 8 (panel A: unlabeled, panel B: ^{13}C -labeled situation). Green: spectra for $t_R = 4.50\text{--}4.52\text{ min}$ showing 4 and 9/10 coeluting, panel C: unlabeled, panel D: ^{13}C -labeled. Red: spectra for $t_R = 4.94\text{ min}$ showing 7, panel E: unlabeled, panel F: ^{13}C -labeled. Upper right: UV/Vis spectra of 4 and collective spectra of the β -carbolines, detected at $t_R = 4.50\text{ min}$.

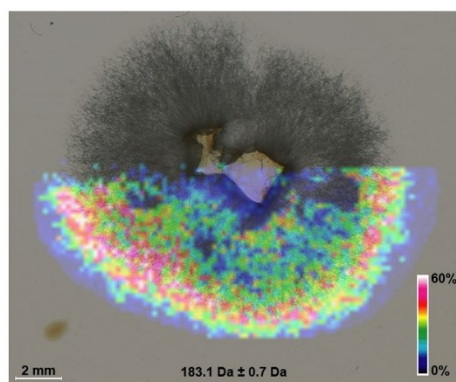


Figure 3. MALDI-MS imaging of *P. cubensis* mycelium. The image was taken to detect $m/z\ 183.1(\pm 0.7)\text{ Da}$, i.e., the mass of 4 $[M+H]^+$, and a portion was overlaid on a photograph of the mycelium. Peripheral areas of the mycelium showed highest abundance (red). The image was digitally optimized for brightness which sets the maximum intensity to 60% of the initial image.

cal research is therefore warranted to determine to what extent *Psilocybe* β -carbolines contribute to the actual psychotropic effects of magic mushrooms. Compounds 1 and 2 are hypothesized to fulfill a protective function in the mushrooms by altering the behavior of invertebrate predators.^[22] Our results therefore also relate to chemical ecology and may help understand if indoleethylamines and β -carbolines co-evolved to fulfill and enhance the same biological function through addressing dissimilar targets.

Experimental Section

Materials and microbiological methods

Chemicals, solvents, and media components were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Deutero, Sigma-Aldrich, Roth, and VWR. Reference compounds of 4 and 5 were purchased from Sigma. Compounds 1, 2, baeocystin, and norbaeocystin were purified from *P. cubensis* carpophores.^[4c,d] Reference compounds of 6–10 were synthesized (below). *Psilocybe* isolates (Table S3, Supporting Information) were maintained on malt extract/peptone (MEP) solid medium (30 g L^{−1} malt extract, 3 g L^{−1} soy peptone, 18 g L^{−1} agar, pH 5.6) at $t = 23^\circ\text{C}$ in the dark. *P. mexicana* sclerotia were produced in preserving jars filled with rye, supplemented with cow manure and straw, and kept in the dark for 3 months. Carpophore production with *P. cubensis* and *P. mexicana* was carried out as described.^[4c] Carpophores of *P. cyanescens* and *P. semilanceata* were collected near Jena, Germany, and dikaryotic isolates thereof deposited in the Jena Microbial Resource Collection (Table S3).

Stable-isotope labeling

P. mexicana FSU13617 was grown in 50 mL liquid MEP medium amended with 1 mM $^{13}\text{C}_{11}$ -L-tryptophan (or 1 mM unlabeled L-tryptophan for control), for 14 d. The biomass was harvested by filtration, lyophilized, homogenized and extracted with 20% (v/v) acetic acid in water. After filtration, the liquid was evaporated under reduced pressure, and the residue was solved in MeOH, filtered, and used for LC/MS (below).

Natural product extraction

Initially, mycelia and carpophores were lyophilized, ground, and extracted with anhydrous MeOH, as described to extract 1 gently and to minimize its artificial dephosphorylation to 2.^[4c] For improved carboline yields, the fungal biomasses (mycelia, carpophores, or sclerotia) were lyophilized, pulverized, and the powder solved in 0.1 M HCl and subsequently extracted with methylene chloride (1:1, v/v). The aqueous phases were collected, the pH value adjusted to 12 using NaOH, which was followed by extractions with methylene chloride. The organic phases were dried under reduced pressure in a rotary evaporator. The resulting crude extracts were dissolved in methanol, centrifuged and filtered, and subsequently used for chromatographic analysis or purification. To quantify 4 titers in fungal biomass, the areas under the curve

(AUCs) in the extracted ion chromatograms were determined and referenced to a standard curve recorded with authentic **4**.

Chromatographic purification of **4** and **5**

Preparative HPLC was performed using an Agilent 1260 instrument equipped with Phenomenex Luna C₁₈ column (250×21.2 mm, 10 µm particle size), and run with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A) and acetonitrile (ACN, solvent B). The flow was 20 mL min⁻¹. A linear gradient was applied with an increase from 10 to 100% B within 20 min. β-Carbolines were further purified by semipreparative HPLC using an Agilent 1200 instrument equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (250×9.4 mm, 5 µm), and the same solvents, applying a flow of 2 mL min⁻¹ and a linear gradient from 10 to 100% B within 10 min. The final purification was accomplished with the same solvents and instrument, but using a Phenomenex Synergi RP-80 column (250×10 mm, 4 µm) and a gradient that included an initial hold at 30% B for 1 min, an increase to 65% B within 10 min, and to 100% B within further 30 sec. This procedure yielded 3.5 mg of **4** and 14.4 mg of **5**, which were dissolved in [D₆]DMSO for subsequent NMR analysis (below).

HPLC and mass spectrometry

HPLC and mass spectrometry were performed on a Thermo Accela liquid chromatograph equipped with a C₁₈ column (Grom-Sil 100 ODS-0 AB, 250×4.6 mm, 3 µm) fitted to an Exactive Orbitrap spectrometer, using electrospray ionization. The respective diode array detectors covered the wavelength range of λ = 200–400 nm. Initially, HPLC-UV chromatograms were extracted at λ = 280 nm (to detect **1**), later at λ = 300 nm to detect β-carbolines. Conditions for HPLC included solvents 0.1% TFA in water (A) and 0.1% TFA in ACN (B) at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The gradient was: initial hold at 10% B for 1 min, and linear increase to 98% B within 4 min.

Standard analytical runs were performed on a Thermo Vanquish Horizon UHPLC system equipped with a diode array and a fluorescence detector. This instrument was equipped with a Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ column (100×2.1 mm, 1.7 µm particle size). For fluorescence detection, excitation and emission were at λ = 340 and 410 nm, respectively. Solvents were 0.1% formic acid (FA) in water (A) and ACN (B) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The gradient was: initial hold at 5% B for 1 min, and linear increase to 100% B within 15 min. Chromatography and mass spectrometry to quantify the concentration of **4** was done on an Agilent 1290 Infinity II UHPLC instrument with a diode array detector (DAD) and interfaced to a 6130 quadrupole mass detector, run in ESI mode. The chromatograph was equipped with a Phenomenex Luna Omega Polar C₁₈ 50×2.1 mm (1.6 µm particle size) and a guard column. Separation was at 25 °C and a flow of 0.5 mL min⁻¹. Mobile phase A was 0.1% aqueous FA, phase B was ACN+0.1% FA. A linear gradient was applied (% B): initially 1%, within 3 min to 10%, and within further 1 min to 100%. UV/Vis spectra were recorded with the diode-array detector during LC-MS analyses. Samples were dissolved in MeOH.

MALDI-MS imaging

P. cubensis mycelium was directly grown on indium tin oxide (ITO)-coated glass slides for Imaging MS. ITO glass slides were placed inside petri dishes and covered with 20 mL of MEP agar to form a thin layer on which cultures were grown at room temperature for up to 4 d. Subsequently, the slides were dried overnight at 37 °C and sprayed with 2.5 mL of universal MALDI matrix (1:1 mixture of 2,5-dihydroxybenzoic acid and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid)

dissolved at 20 mg mL⁻¹ in a mixture of acetonitrile, methanol and water (70:25:5), using the automatic ImagePrep device 2.0 (Bruker Daltonics) with 60 consecutive cycles (a 180° rotation of the sample after 30 cycles was performed) of 31 seconds (1 s spraying, 10 s incubation time, and 20 s of active drying). Samples were then analyzed on an UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics), operated in the positive reflector mode using flexControl 3.0. The analysis was performed from 100 Da to 3,000 Da, accumulating 500 shots by taking 10 random shots at each raster position (raster width 200 µm). The acquisition method was externally calibrated using the Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics). Spectra were processed with baseline subtraction in flexAnalysis 3.3. Images were obtained using root mean square normalization and brightness optimization.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer at 300 K. The solvent was [D₆]DMSO. ¹H and ¹³C NMR chemical shifts were referenced relative to residual protons present in deuterated DMSO at δ_H = 2.49 ppm and δ_C = 39.5 ppm.

Syntheses of reference compounds

To synthesize **6**, we followed the protocol by Snyder et al.^[23] but substituted ethyl acetate by formaldehyde. The synthesis of **7** was carried out as described.^[18] For **8** synthesis, a published procedure was applied,^[24] but replacing HBr by HCl. A mixture of **9** and **10** was synthesized following a published procedure.^[25]

Acknowledgements

We gratefully acknowledge A. Perner, H. Heinecke, S. Schieferdecker, and V. Valiante (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute, Jena) for recording high-resolution mass and NMR spectra, and for providing ¹³C₁₁-L-tryptophan, respectively. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant HO2515/7-1 to D.H.) and by the DFG Collaborative Research Center CRC 1127 (ChemBioSys, to C.H. and D.H.).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: alkaloids · ayahuasca · beta-carboline · natural products · psilocybin

- [1] R. E. Schultes, *Amer. Anthropol.* **1940**, *42*, 429–443.
- [2] J. Fricke, C. Lenz, J. Wick, F. Blei, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 897–903.
- [3] a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, *Experientia* **1958**, *14*, 107–109; b) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572.
- [4] a) A. Y. Leung, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1667–1671; b) N. Jensen, J. Gartz, H. Laatsch, *Planta Med.* **2006**, *72*, 665–666; c) C. Lenz, J. Wick, D. Hoffmeister, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2835–2838; d) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12352–12355; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524–12527; e) F. Blei, J. Fricke, J. Wick, J. C. Slot, D. Hoffmeister, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 2160–2166.
- [5] F. Hasler, U. Grimberg, M. A. Benz, T. Huber, F. X. Vollenweider, *Psychopharmacology* **2004**, *172*, 145–156.

- [6] T. Passie, J. Seifert, U. Schneider, H. M. Emrich, *Addict. Biol.* **2002**, *7*, 357–364.
- [7] F. Hasler, D. Bourquin, R. Brenneisen, T. Bär, F. X. Vollenweider, *Pharm. Acta Helv.* **1997**, *72*, 175–184.
- [8] a) D. J. McKenna, G. H. Towers, F. Abbott, *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *10*, 195–223; b) E. A. Estrella-Parra, J. C. Almanza-Pérez, F. J. Alarcón-Aguilar, *Nat. Prod. Bioprospect.* **2019**, *9*, 251–265.
- [9] L. Rivier, J. E. Lindgren, *Econ. Bot.* **1972**, *26*, 101–129.
- [10] J. R. F. Allen, B. R. Holmstedt, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1573–1582.
- [11] F. A. O. Rasse-Suriani, F. S. García-Einschlag, M. Rafti, T. Schmidt De León, P. M. David Gara, R. Erra-Balsells, F. M. Cabrerizo, *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 36–51.
- [12] T. Liu, W. Liang, G. Tu, *Planta Med.* **1988**, *54*, 472–473.
- [13] a) K. A. Shaaban, S. I. Elshahawi, X. Wang, J. Horn, M. K. Kharel, M. Leggas, J. S. Thorson, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1723–1729; b) T. Zhao, S. S. Zheng, B. F. Zhang, Y. Y. Li, S. W. A. Bligh, C. H. Wang, Z. T. Wang, *Food Chem.* **2012**, *134*, 1096–1105.
- [14] a) W. Steglich, L. Kopanski, M. Wolf, M. Moser, G. Tegtmeyer, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2341–2344; b) R. J. Jaeger, M. Lamshöft, S. Gottfried, M. Spitteller, P. Spitteller, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 127–134.
- [15] M.-L. Yang, P.-C. Kuo, T.-L. Hwang, T.-S. Wu, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1996–2000.
- [16] A. M. Sherwood, T. E. Prisinzano, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 1–3.
- [17] A. Miralles, S. Esteban, A. Sastre-Coll, D. Moranta, V. J. Asensio, J. A. García-Sevilla, *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *518*, 234–242.
- [18] W. P. Gessner, A. Brossi, M. E. Bembenek, C. W. Abell, *Arch. Pharm.* **1988**, *321*, 95–98.
- [19] H. Komulainen, J. Tuomisto, M. M. Airaksinen, I. Kari, P. Peura, L. Pollari, *Acta Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *46*, 299–307.
- [20] J. M. Ward, J. E. Hodgson, *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *110*, 239–242.
- [21] H. A. Geiger, M. G. Wurst, R. N. Daniels, *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 2438–2447.
- [22] H. T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H. B. Korotkin, P. B. Matheny, J. C. Slot, *Evol. Lett.* **2018**, *2*, 88–101.
- [23] H. R. Snyder, S. M. Parmerter, R. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 222–225.
- [24] H. Song, Y. Liu, Y. Liu, L. Wang, Q. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1010–1018.
- [25] I. Nemet, L. Varga-Defterdarovic, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4551–4562.

Manuscript received: September 20, 2019

Accepted manuscript online: November 14, 2019

Version of record online: December 13, 2019

CHEMISTRY

A European Journal

Supporting Information

Simultaneous Production of Psilocybin and a Cocktail of β -Carboline Monoamine Oxidase Inhibitors in “Magic” Mushrooms

Felix Blei^{+, [a]} Sebastian Dörner^{+, [a]} Janis Fricke^[a] Florian Baldeweg^[a] Felix Trottmann^[b]
Anna Komor^[b] Florian Meyer^[c] Christian Hertweck^[b, d] and Dirk Hoffmeister^{*[a]}

chem_201904363_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of contents

Figure S1: ^1H NMR spectrum of 4	2
Figure S2: ^{13}C NMR spectrum of 4	2
Figure S3: ^1H , ^1H COSY spectrum of 4	3
Figure S4: ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of 4	3
Figure S5: ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of 4	4
Figure S6: ^1H NMR spectrum of 5	4
Figure S7: ^{13}C NMR spectrum of 5	5
Figure S8: ^1H , ^1H COSY spectrum of 5	5
Figure S9: ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of 5	6
Figure S10: ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of 5	6
Table S1: NMR data of 4 and 5	7
Table S2: β -carboline concentrations in <i>Psilocybe</i> mushrooms	8
Table S3: <i>Psilocybe</i> strains	9

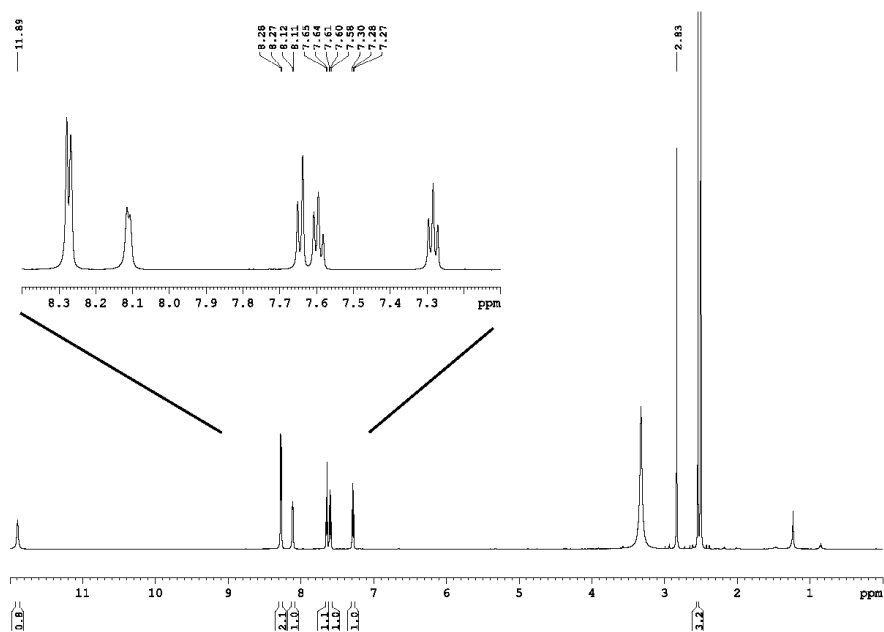


Figure S1. ¹H NMR spectrum of **4** in DMSO-*d*₆

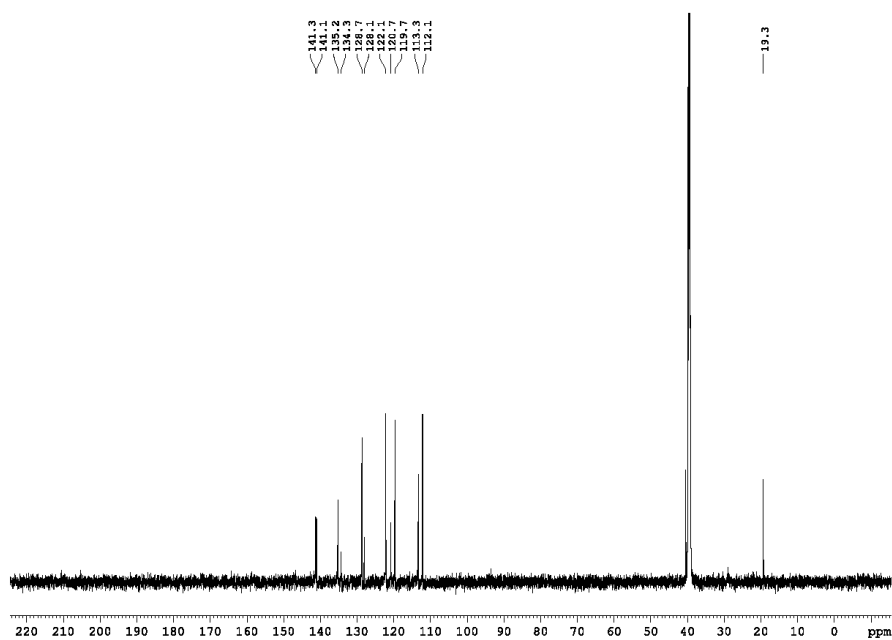


Figure S2. ¹H-decoupled ¹³C NMR spectrum of **4** in DMSO-*d*₆

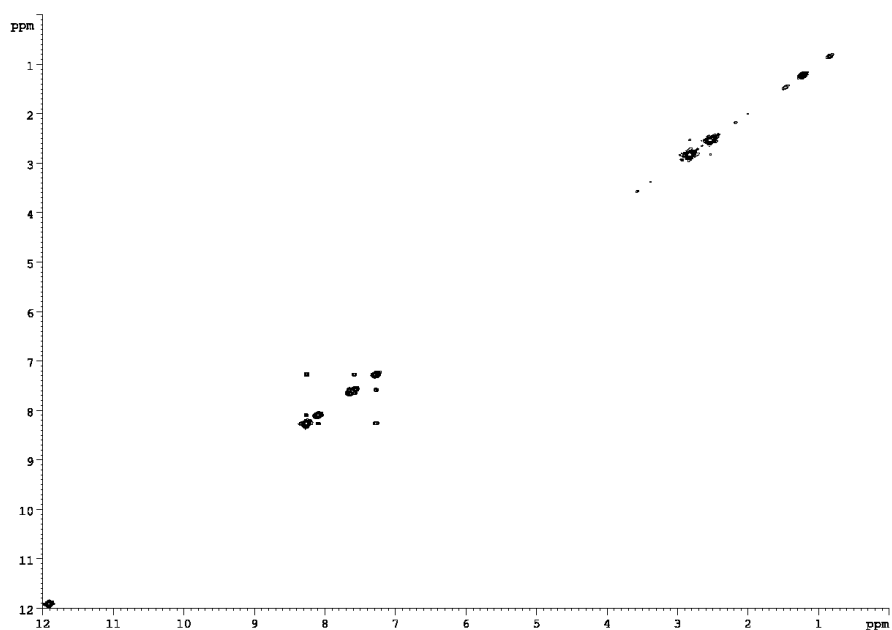


Figure S3. ^1H , ^1H COSY spectrum of **4** in $\text{DMSO}-d_6$

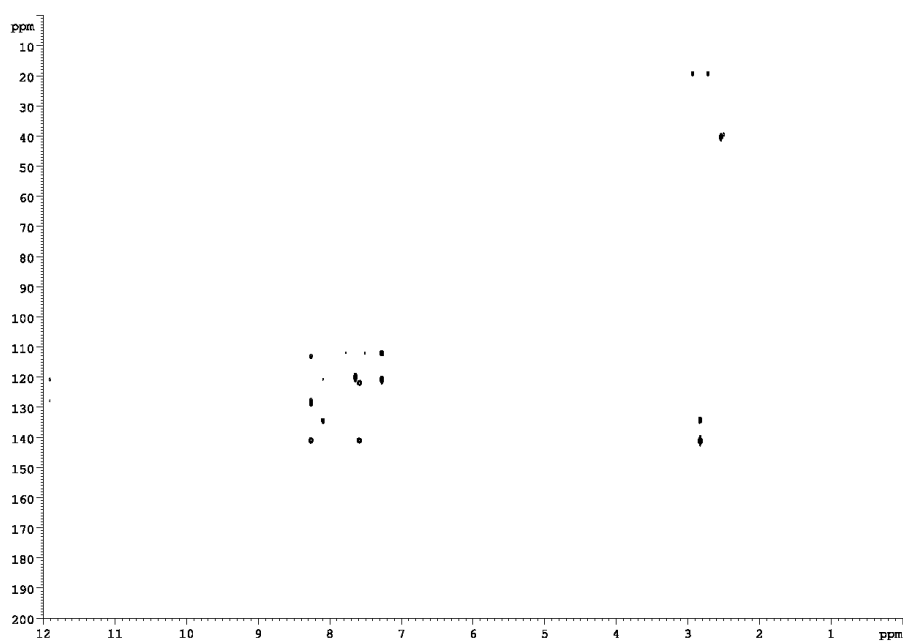
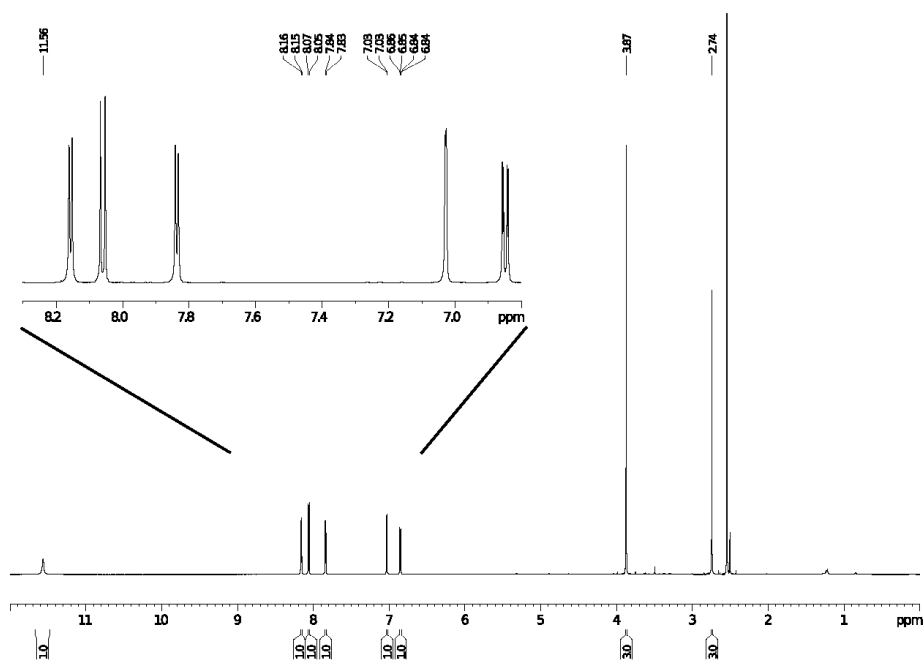
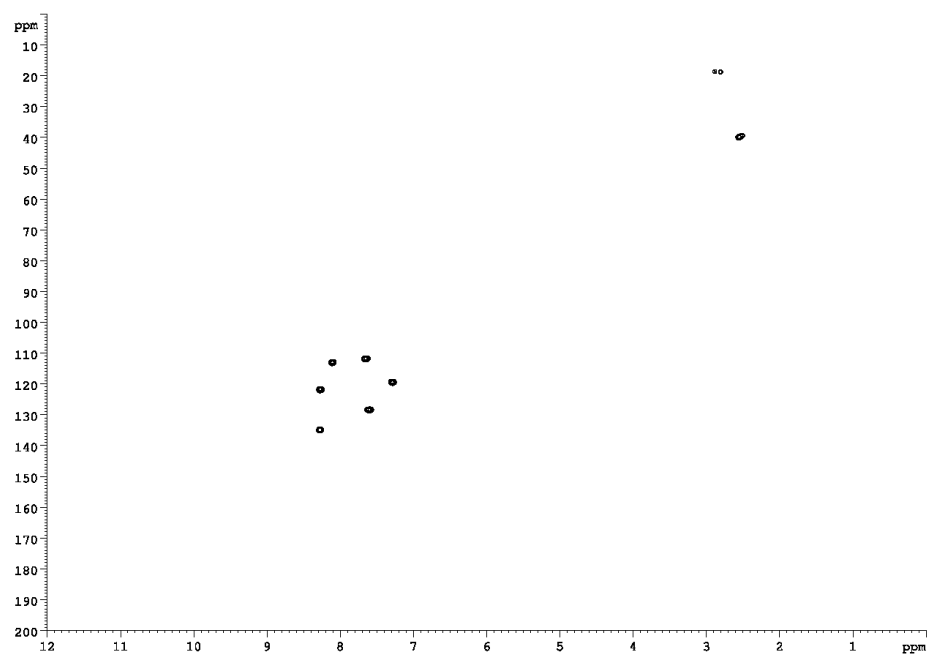


Figure S4. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of **4** in $\text{DMSO}-d_6$



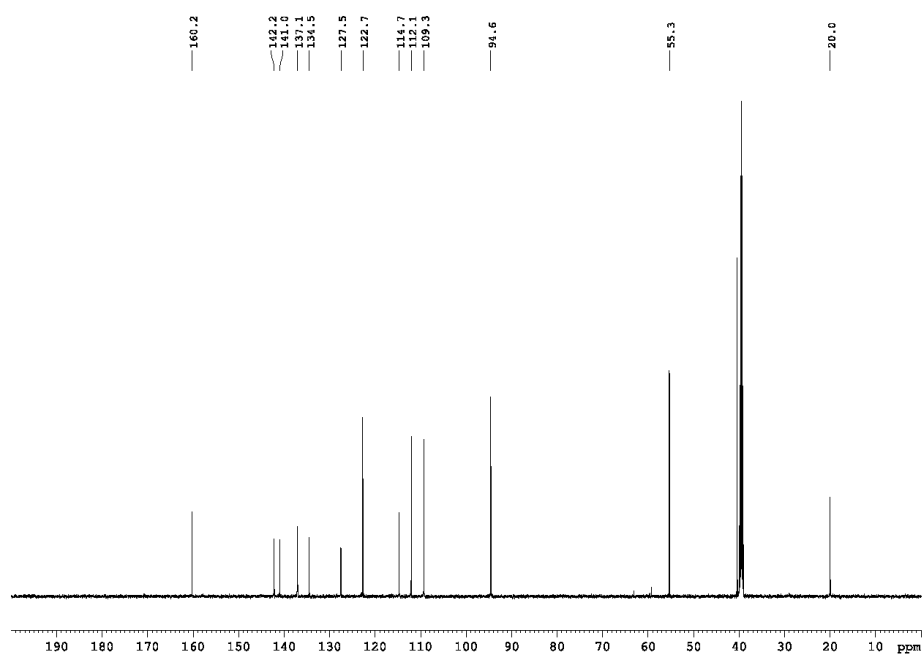


Figure S7. ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum of **5** in $\text{DMSO-}d_6$

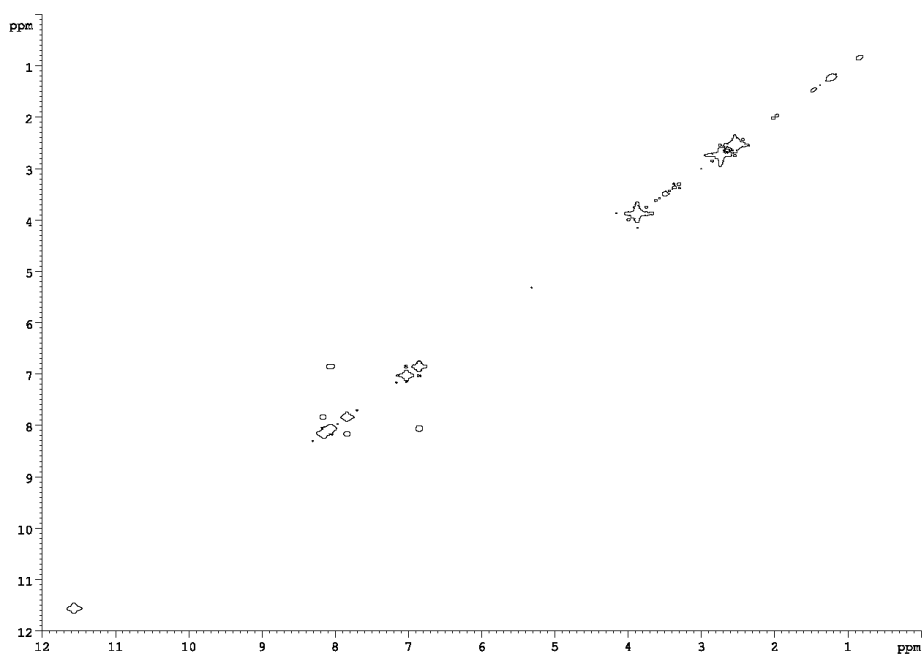


Figure S8. ^1H , ^1H COSY spectrum of **5** in $\text{DMSO-}d_6$

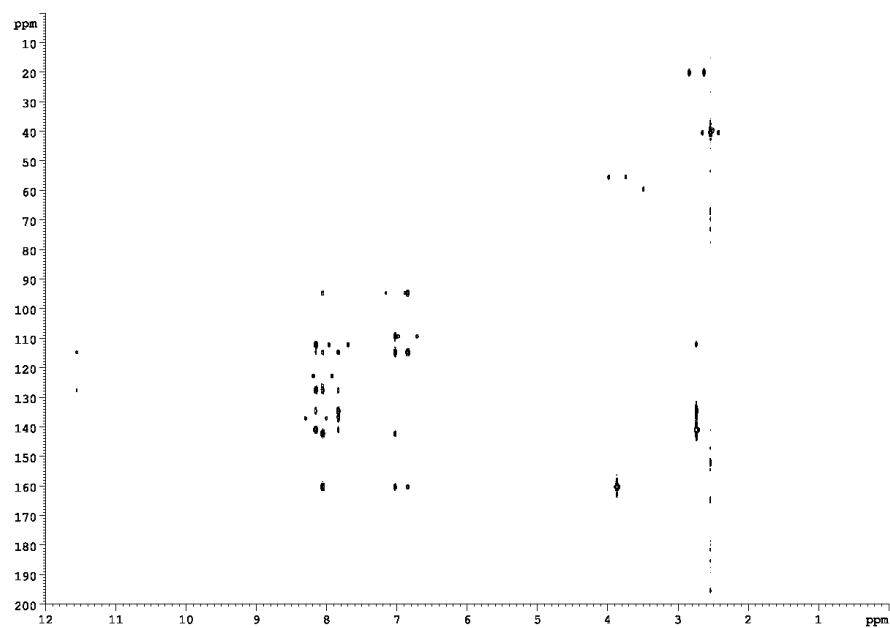


Figure S9. ^1H , ^{13}C HMBC spectrum of **5** in $\text{DMSO}-d_6$

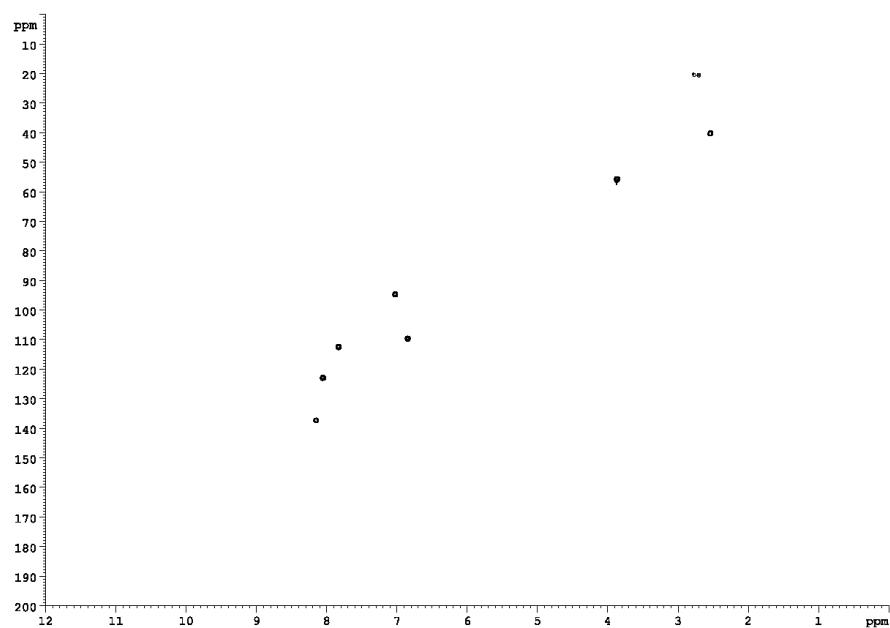


Figure S10. ^1H , ^{13}C HSQC spectrum of **5** in $\text{DMSO}-d_6$

Table S1. NMR spectroscopic data of *Psilocybe* β -carbolines in DMSO- d_6 . Numbering of positions, COSY (bold lines) and selected HMBC (red arrows) key correlations are shown below the table.

harmine (4)					harmine (5)			
pos.	δ_c [ppm]	δ_H [ppm], M (J [Hz])	COSY ($^1H \rightarrow ^1H$)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_c [ppm]	δ_H [ppm], M (J [Hz])	COSY ($^1H \rightarrow ^1H$)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	141.3	-			141.0	-		
2	-	-			-	-		
3	135.2	8.27, d (5.4)*	4	1, 4a	137.1	8.16, d (5.3)	4	1, 4, 4a
4	113.3	8.11, d (5.4)	3	4b, 9a	112.1	7.84, d (5.3)	3	3, 4b, 9a
4a	128.7	-			127.5	-		
4b	120.7	-			114.7	-		
5	122.1	8.28, d (8.0)*	6	7, 8a	122.7	8.06, d (8.6)	6	7, 4a, 8a
6	119.7	7.28, dd (8.0, 7.0)*	5, 7	4b, 8	109.3	6.85, dd (2.3, 8.6)	5	4b, 8
7	128.1	7.60, dd (8.2, 7.0)*	8, 6	5, 8a	160.2	-		
8	112.1	7.64, d (8.2)	7	4b, 6	94.6	7.03, d (2.0)		4b, 6, 7, 8a
8a	141.1	-			142.2	-		
9	-	11.89, s		4a, 4b	-	11.56, s		4a, 4b
9a	134.3	-			134.5	-		
CH ₃	19.3	2.83, s		1, 9a	55.3	3.87, s		7
OCH ₃	-	-	-	-	20.0	2.74, s		1, 9a

* coupling constants taken from sel-TOCSY (7.28 and 8.11 ppm).

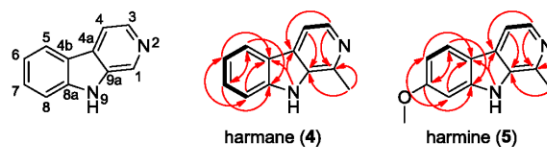


Table S2. β -carboline concentrations in *Psilocybe cubensis* and *P. mexicana* ($\mu\text{g/g}$ dry mass).

harmaline (4)

	<i>P. cubensis</i>	<i>P. mexicana</i>
carpophores	0.08	n.d.
mycelium	1.32	21.48
sclerotia	-	2.01

harmine (5)

	<i>P. cubensis</i>	<i>P. mexicana</i>
carpophores	0.10	0.04
mycelium	0.08	0.61
sclerotia	-	1.62

Table S3. *Psilocybe* strains used in this study.

Species	Isolate	Nuclear state	Material analyzed
<i>P. cubensis</i> ^[1]	FSU12407	dikaryon	cultivated carpophores, mycelium
<i>P. cubensis</i> ^[1]	FSU12410	dikaryon	cultivated carpophores
<i>P. cyanescens</i>	FSU12414	dikaryon	collected carpophores
<i>P. semilanceata</i>	FSU13616	dikaryon	collected carpophores
<i>P. mexicana</i>	FSU13617	dikaryon	cultivated carpophores, sclerotia, mycelium

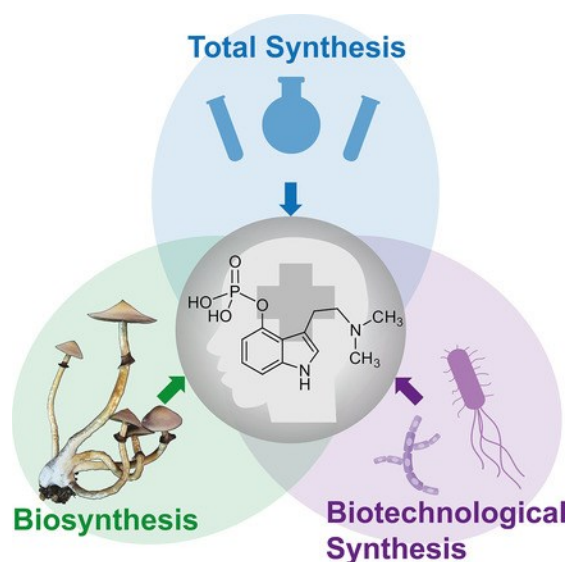
[1] C. Lenz, J. Wick, D. Hoffmeister, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2835-2838.

3.6 Production options for psilocybin: Making of the magic.

Janis Fricke, Claudius Lenz, Jonas Wick, **Felix Blei**, Dirk Hoffmeister

Chemistry - A European Journal, Band 25, Ausgabe 4, Seiten 897-903, 2019

Zusammenfassung:



Psilocybin, ein psychotroper Wirkstoff der von einigen Basidiomyceten aus der Ordnung der Agaricales gebildet wird, ist erneut in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Aktuelle Studien legen nahe, dass der Wirkstoff Psilocybin, das Prodrug zu dem eigentlichen Wirkstoff Psilocin, ein breites therapeutisches Anwendungsspektrum aufweist. Dieser Übersichtsartikel beschreibt ausführlich, auf welchen verschiedenen Wegen die Herstellung von Psilocybin für eine zukünftige

Anwendung erfolgen kann. Inbegriffen ist die enzymatische *in vitro*-Synthese und die *in vivo*-Produktion in einem Heterologen Wirt, die Biotransformation zur Erzeugung von Derivaten sowie chemische Synthese-Routen zur Erzeugung von Psilocybin.

Angaben zum Eigenanteil: 10 %

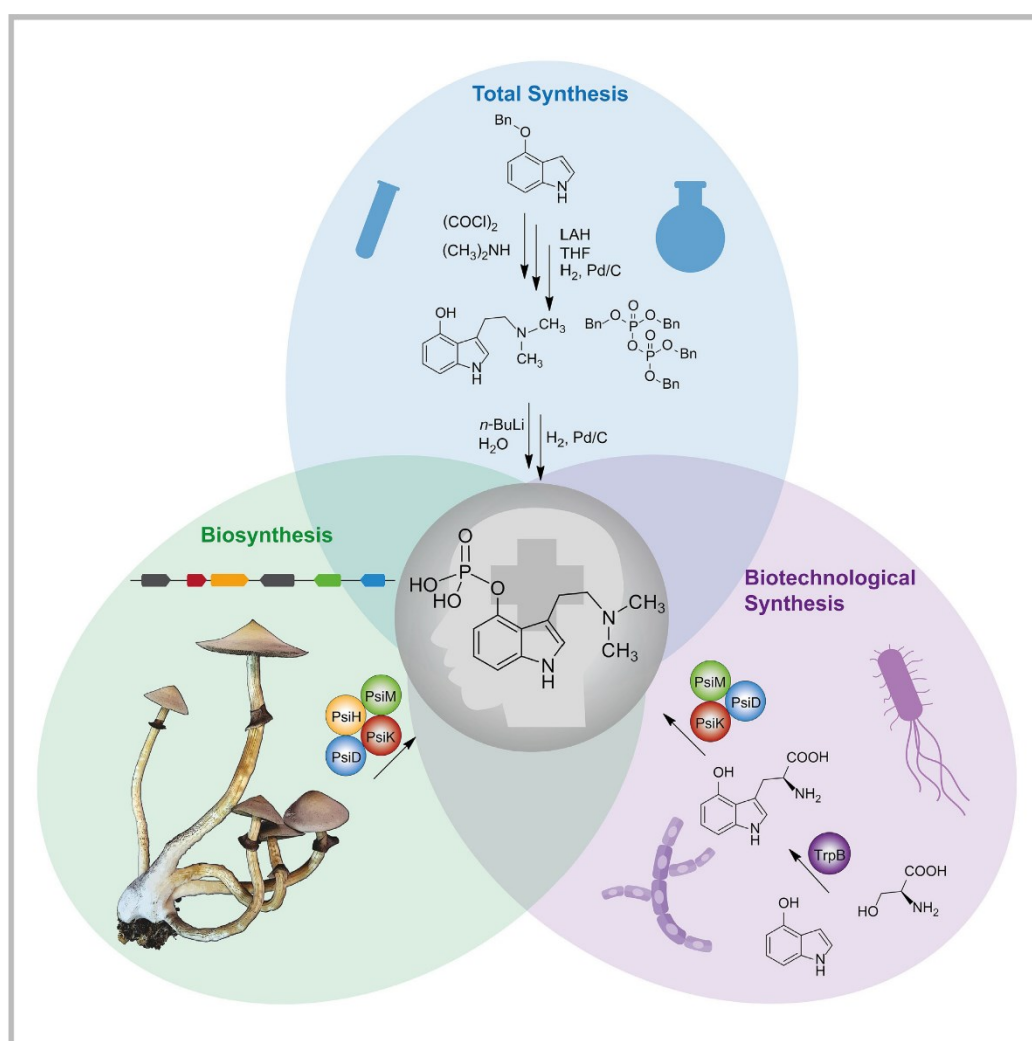
Mitarbeit am Manuskript

Jena, den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

■ Natural Products | Reviews Showcase |

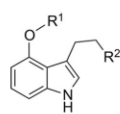
🍄 Production Options for Psilocybin: Making of the Magic

Janis Fricke, Claudius Lenz, Jonas Wick, Felix Blei, and Dirk Hoffmeister*^[a]

Abstract: The fungal genus *Psilocybe* and other genera comprise numerous mushroom species that biosynthesize psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine). It represents the prodrug to its dephosphorylated psychotropic analogue, psilocin. The colloquial term “magic mushrooms” for these fungi alludes to their hallucinogenic effects and to their use as recreational drugs. However, clinical trials have recognized psilocybin as a valuable candidate to be developed into a medication against depression and anxiety. We here highlight its recently elucidated biosynthesis, the concurrently developed concept of enzymatic in vitro and heterologous in vivo production, along with previous synthetic routes. The prospect of psilocybin as a promising therapeutic may entail an increased demand, which can be met by biotechnological production. Therefore, we also briefly touch on psilocybin’s therapeutic relevance and pharmacology.

Introduction

For decades, pharmaceutical chemistry has recognized microbial natural products as a valuable source for new drugs and drug leads.^[1] Research has primarily been driven by the quest for new anti-infectives and anticancer compounds. Fungal metabolites have also served as immunosuppressants and lipid-lowering agents.^[2] Depression and cancer-related anxiety are surely not among the conditions that would readily be associated with a fungal product as a promising treatment option. However, psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine, **1**, Figure 1), currently entering phase III clinical trials, is exactly



psilocybin (1):	R ¹ = PO ₃ H ₂	R ² = N(CH ₃) ₂
psilocin (2):	R ¹ = H	R ² = N(CH ₃) ₂
norbaeocystin (3):	R ¹ = PO ₃ H ₂	R ² = NH ₂
baeocystin (4):	R ¹ = PO ₃ H ₂	R ² = NHCH ₃
norpsilocin (5):	R ¹ = H	R ² = NHCH ₃
aeruginascin (6):	R ¹ = PO ₃ H ₂	R ² = N ⁺ (CH ₃) ₃

Figure 1. Chemical structures of psilocybin and related alkaloids from *Psilocybe* species and other “magic mushrooms”.

that.^[3] It is the major metabolite of the hallucinogenic so-called magic mushrooms and undoubtedly represents one of the most prominent natural products. We present the recently characterized biosynthesis enzymes of **1** and the concept of its

biotechnological production in vitro and in a heterologous system in vivo. We also review synthetic routes to **1** and include a view back on the history of **1** and ahead to its future as a valuable therapeutic.

Spotlights on Psilocybin’s History

“The first thing which they ate at the gathering was small, dark mushrooms (...). These are inebriating and induce visions to be seen and even provoke sensuousness.”
(Bernardino de Sahagún, 1499–1590)

In his eminent *Historia general de las cosas de la Nueva Espana* (General History of the Things of New Spain), the Franciscan friar Bernardino de Sahagún provided an extraordinary ethnographic account on the indigenous people of today’s Mexico, their culture, and their ceremonies. His report also documents the phenomenal pharmacological effects of psychotropic and hallucinogenic tryptamine-like alkaloids: psilocin (4-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine, **2**, Figure 1) is the actual psychotropic principle and unstable dephosphorylated follow-up product of **1**, which is more stable and the biosynthetically made metabolite. Minor mushroom alkaloids include norbaeocystin (**3**), baeocystin (**4**), norpsilocin (**5**), and the quaternary ammonium salt of **1**, aeruginascin (**6**) as non-, mono-, and trimethylated congeners.^[4]

Botanist Richard E. Schultes (1915–2001) investigated the lost and misinterpreted identity of the “plant” that caused the effects described in the ancient reports from Central America^[5] and the associated mushrooms of the genus *Panaeolus* (which includes species that produce **1**). Ethnomycologist R. Gordon Wasson (1898–1986) and his wife Valentina (1901–1958) collected specimens and had the opportunity to participate in a mushroom ritual of native Mexicans. The fungi were identified by mycologist Roger Heim (1900–1979) as members of the genera *Stropharia*, *Conocybe*, and *Psilocybe*.^[6] He also provided chemist Albert Hofmann (1906–2008) at Sandoz Laboratories with *Psilocybe mexicana* fruiting bodies, who succeeded in isolating **1** and **2** and in elucidating their structures.^[4a–c] Subsequently, close to 200 species, in the above genera and in *Gymnopilus*, *Pluteus*, and *Inocybe* species, have been confirmed as producers of **1**. The content of **1** depends on the extraction and workup method, as it may decompose to **2**.^[4d] Reported values are typically about 0.85 % of the dry mass for *Psilocybe serbica*, approximately 1.0 % for *P. semilanceata*, and around 1.5–1.8 % in *P. azurescens*.^[7]

Structurally, these alkaloids are fairly simple and achiral, and they are closely related to the neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine). Compound **1** has a molecular mass of *m/z* = 284.1 (C₁₂H₁₇N₂O₄P), yet it uniquely combines two structural elements that are, each in their own way, unusual. First, a 4-hydroxyindole moiety is a very rare and distinctive structural feature among natural products. Second, **1** (and **3**, **4**, and **6** alike) features a phosphate ester, which is also comparatively rare in natural products, though is frequently found in energy metabolism and cellular signaling.

[a] J. Fricke, C. Lenz, J. Wick, F. Blei, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmaceutical Microbiology
Hans-Knöll-Institute Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under: <https://doi.org/10.1002/chem.201802758>.

Selected by the Editorial Office for our Showcase of outstanding Review-type articles (www.chemeurj.org/showcase).

Pharmacology of Psilocybin

A closer look at the pharmacology of **1** clarifies the reason behind the “magic” (i.e., the hallucinogenic effects) of the above fungi (Figure 2): after ingestion, cleavage of the phos-

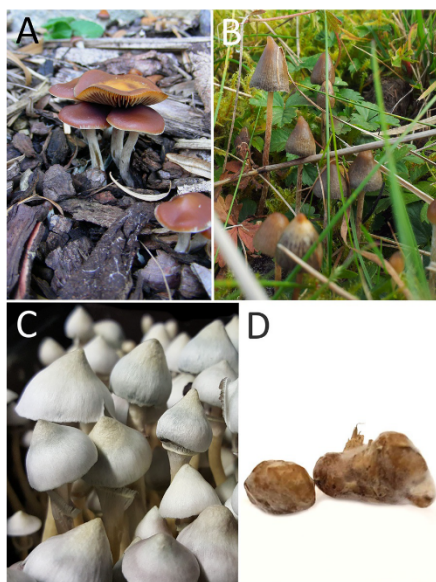


Figure 2. Mature fruiting bodies of a) *P. cyanescens* and b) *P. semilanceata* as producers of **1**. c) Cultivated mushrooms of an unpigmented *P. cubensis* strain. d) *Psilocybe* sclerotia containing **1**—Sclerotia are resilient fungal structures that withstand unfavorable environmental conditions.

phate ester occurs, which converts prodrug **1** into **2**.^[7c] The latter compound interferes with serotonergic neurotransmission, as it agonistically acts on 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} and 5-HT_{2C} receptors (equilibrium dissociation constant, K_i = 6 nM for the 5-HT_{2A} receptor) and, to a lesser extent, on 5-HT_{1A} receptors of the human nervous system.^[7c,8] The threshold dose for **1** is about 5 mg, and uptake of 12–20 mg per os (oral delivery) causes an altered state of consciousness.^[8] A lethal dose can only be estimated theoretically.^[7c] Somatic effects include dilated pupils, altered heart rate and blood pressure, among others. The perceptual effects become manifested in an altered sense of time (it appears to be virtually standing still), synaesthesia, and visual hallucinations, such as fractals and multicolored geometric objects.^[7c,8a] Notable psychic effects are enhanced introspect, decreased depression, and mystical experiences, which is why native Central Americans considered these mushrooms divine and referred to them as “Flesh of the Gods”.

How Mushrooms Make Psilocybin

The historically earliest and still popular—albeit now illicit—way for humans to have access to **1** is to ingest the producing organism, that is, to use its biosynthetic capacity, but how do mushrooms produce **1**?

Its origin from L-tryptophan (**8**) was established early on.^[9] Today's knowledge on its biosynthesis is rooted in seminal work by pharmaceutical chemists Stig Agurell (1932–2018) and J. Lars Nilsson (1938–2014). They synthesized various ¹⁴C- and ³H-radiolabeled presumed precursors, fed them to fungal mycelium, and traced incorporation into **1**. In their work, these authors propose a five-step biosynthesis beginning with **8** that successively undergoes decarboxylation to tryptamine (**9**), repeated methylation to *N,N*-dimethyltryptamine (**10**), 4-hydroxylation to yield **2**, and 4-*O*-phosphorylation leading to the formation of **1** (Scheme 1).^[10] On the basis of their results, these authors also hypothesize that alternative pathways to **1** may exist.

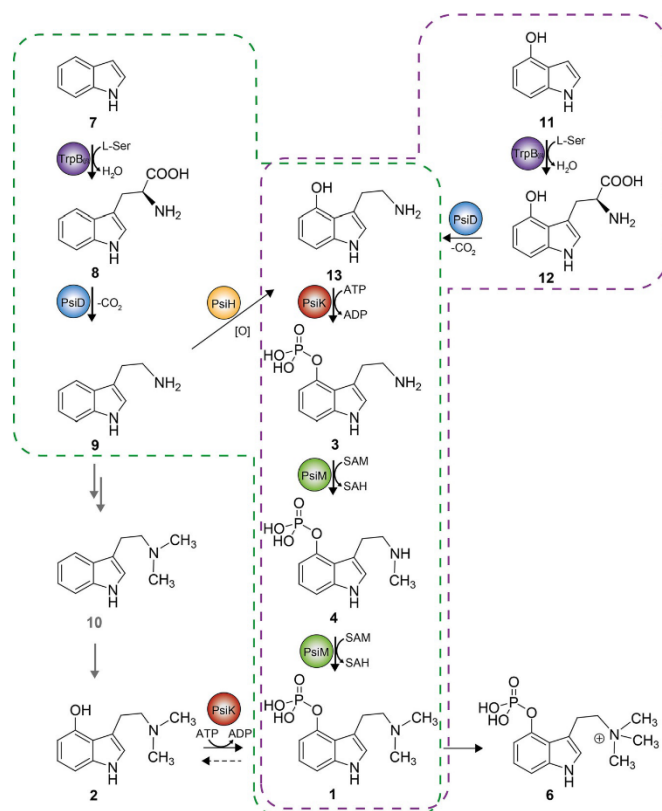
Half a century later, genomics greatly helped advance our understanding of the biosynthetic events. The genome sequences of various species producing **1**, including *P. cubensis*, a European isolate of the wider *P. cyanescens* species complex (*P. serbica*), a North American strain of *P. cyanescens* sensu stricto, *Panaeolus cyanescens*, and *Gymnopilus dilepis* have been reported.^[11] These species share a set of genes in an approximately 11–22-kb portion in their genomes that encodes four biosynthesis enzymes along with transporters (Figure 3). Heterologous production of the putative decarboxylase PsiD, the kinase PsiK, and the methyltransferase PsiM in *Escherichia coli* and in vitro activity assays were performed. *Aspergillus niger* was used for in vivo characterization of PsiH, a putative P₄₅₀ monooxygenase. The activities found confirmed the hypothesis that these enzymes catalyze the formation of **1**. Concurrently, the substrate specificity profiles revealed unexpected results regarding the order of biosynthetic events and the emerging option of the biotechnological production of **1**.

PsiD catalyzes the decarboxylation of **8** into **9** as the initial step but is not strictly specific, as it also decarboxylates 4-hydroxy-L-tryptophan (**12**), which is advantageous for the in vitro production of **1**. Curiously, PsiD is entirely unrelated to known fungal and plant aromatic L-amino acid decarboxylases. Rather, it belongs to the family of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-independent phosphatidylserine decarboxylases.^[11a]

PsiH is a P₄₅₀ monooxygenase that selectively hydroxylates the 4-position of **9** to produce 4-hydroxytryptamine (**13**) as a second biosynthetic step (Scheme 1).^[11a]

PsiK catalyzes the subsequent phospho-transfer step onto **13** to yield **3**. Opposite to the previous view, **2** is not the precursor of **1** but serves as a PsiK substrate as well. The reason and biosynthetic implications need to be viewed in the context of the methyltransferase PsiM.^[11a]

The PsiM-catalyzed methyl-transfer steps convert **3** via **4** into **1**, which concludes the biosynthesis.^[11a] The specificity of PsiM is remarkable. Aside from mere trace amounts of product **5**, detected with **13** as a methyl acceptor,^[4e] PsiM seems to re-



Scheme 1. Biosynthesis of **1**. The green dashed frame indicates cellular biosynthesis, and the purple frame indicates enzymatic synthesis in vitro beginning from 4-hydroxyindole (**11**) or **12**. Gray arrows (left) symbolize the biosynthetic pathway initially proposed by Agurell and Nilsson,^[10] who also assumed alternative routes toward **1**. Aeruginascin (**6**) has only been described from *Inocybe aeruginascens*, not from *Psilocybe* species. ATP = adenosine triphosphate, ADP = adenosine diphosphate, SAM = S-adenosylmethionine, SAH = S-adenosylhomocysteine.

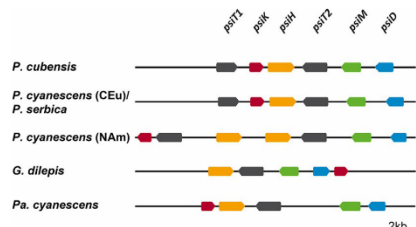


Figure 3. Genetic loci encoding enzymes for the biosynthesis of **1** in *Psilocybe cubensis*, a Central European (CEu) isolate of the *P. cyanescens* species complex (*P. serbica*), a North American (NAM) isolate of *P. cyanescens* sensu stricto, *Gymnopilus dilepis*, and *Panaeolus cyanescens*. The genes *psiK* (red) and *psiH* (gold) code for the kinase and the tryptamine monooxygenase, respectively, which modify the indole core. The genes *psiM* (green) and *psiD* (blue) code for the methyltransferase and the L-tryptophan decarboxylase, respectively, which initiate and conclude the biosynthesis of **1**. Putative transporter genes (e.g., *psiT1* and *psiT2* in *P. cubensis*) are shown in dark gray. Only the biosynthesis of **1** and transport genes are shown.

quire a 4-O-phosphoryloxy group for proper substrate recognition.

The above enzyme characteristics imply that neither **2** nor **10** is a pathway intermediate: the tight specificity of PsiM excludes the formation of **10** (which would precede **2** by only one step and become biosynthesized through hydroxylation by the substrate-flexible PsiH). Further, if **2** occurs, for example, by intracellular dephosphorylation, it is rephosphorylated by PsiK and is converted into **1**. Hence, the pathway is designed to prevent, rather than support, the formation of **2**. Still, **2** has been reported from *Psilocybe* species,^[7d] yet the reported quantities represent an artifact generated during workup.^[24e]

The identification of the biosynthetic enzymes toward **1** laid the foundation for its biotechnological synthesis, for which two different routes can be envisioned. The first option includes enzymatic synthesis in vitro, whereas the alternative route involves reconstitution of the pathway in vivo by introducing the biosynthesis genes into a suitable host.

Enzymatic Production In Vitro

As indicated above, PsiD accepts **12** as a substrate. This substrate has been used to initiate the in vitro process. Consequently, the PsiH-catalyzed hydroxylation can be eliminated, which helps to reduce the number of steps and, hence, the number of involved enzymes. Otherwise, the procedure would require a compatible P_{450} reductase as a redox partner to supply the monooxygenase with electrons. As proof of concept and without any further optimization, in a PsiD/PsiK/PsiM one-pot reaction (Scheme 1), amended with the respective co-substrates, 15 μmol of **12** was turned over into 3.9 μmol of **1**.^[11a] Minor amounts of precursors **3** and **4** were also present after the reaction. For the first time, **1** was obtained neither from a mushroom nor synthetically.

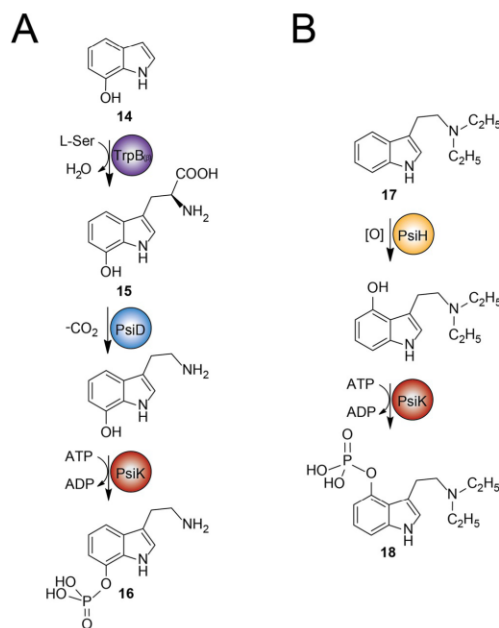
Very recently, this procedure was extended by making use of the flexibility of the *P. cubensis* tryptophan synthase TrpB.^[12] In fungi, tryptophan synthases are α/β -homodimers, and they catalyze the penultimate and terminal steps in the biosynthesis of **8**, which is the cleavage of 1-(indole-3-yl)glycerol phosphate in the first half reaction by the α subunit to release indole (**7**) for the second half reaction.^[13] The latter is catalyzed by the β subunit and condenses **7** and L-serine into **8**. Precedence for flexible tryptophan synthases stems from bacterial representatives. Specifically, their β subunits are useful to generate halogenated tryptophan derivatives by offering the respective substituted indoles as substrate, whereas β -methylated tryptophan is produced upon replacing L-serine with L-threonine.^[14] *P. cubensis* TrpB is the first mushroom tryptophan synthase to be characterized and is also flexible for substituted indoles. Particularly, it accepts 4-hydroxyindole (**11**), which allowed its integration into the production of **1** (Scheme 1). In a four-enzyme, one-pot reaction, **12** was produced by TrpB from L-serine and **11** as inexpensive building blocks and was further converted by PsiD, PsiK, and PsiM into **1**.^[12] About 20% of added **11** was converted into **1**.

Enzymatic Production of Psilocybin Congeners

Intriguingly, *P. cubensis* TrpB accepts 7-hydroxyindole (**14**) as a substrate as well and, consequently, produces 7-hydroxy-L-tryptophan (**15**) in vitro. A combined TrpB/PsiD/PsiK/PsiM assay led to the formation of a new congener of **1**, isonorbaecocystin (**16**, 7-phosphoryloxytryptamine, Scheme 2), which proved that PsiD and PsiK were cooperative and accepted the respective intermediates.^[12]

However, **16** was not methylated into the respective isomer of **1**. This is consistent with the previously observed specificity of the methyltransferase PsiM. As a perspective to develop further the concept of facile in vitro production of derivatives of **1**, future work may focus on directed evolution or site-specific engineering of *P. cubensis* PsiM to eliminate its gatekeeper role against the formation of **2** by relaxing its specificity.

An earlier approach included the biotransformation of *N*-alkyltryptamines, fed to fungal mycelia.^[15] For example, *N,N*-diethyltryptamine (**17**) was hydroxylated and phosphorylated to 4-phosphoryloxy-*N,N*-diethyltryptamine (**18**) by *P. cubensis*



Scheme 2. a) In vitro enzymatic pathway to isonorbaecocystin (**16**).^[12] b) Biotransformation of *N,N*-diethyltryptamine (**17**) into 4-phosphoryloxy-*N,N*-diethyltryptamine (**18**) by *P. cubensis*.^[15] Catalysis by PsiH and PsiK has not yet been proven but is likely.

(Scheme 2). This result adds to the notion of the flexible PsiH/PsiK enzyme pair, which are the most plausible candidates to have catalyzed this biotransformation.

Heterologous In Vivo Production

Detailed knowledge of the biosynthesis of **1** paved the way for the genetic engineering of a naïve microbial host for heterologous in vivo production. As a reliable and robust model organism, the *Aspergillus nidulans* mold was chosen.^[16] To reconstitute the biosynthesis, all four biosynthesis genes needed to be inserted into the host genome. Further, concerted gene expression was critical. Briefly, a tetracyclin-inducible gene expression system (the so-called Tet-On cassette) was harnessed and combined with an advanced approach to produce the biosynthesis enzymes from a single transcript as a polycistron (i.e., expressing multiple genes as one mRNA molecule, which is still translated into discrete enzymes). In standard small-volume Erlenmeyer shake flasks and without further optimization of the culture conditions and media, **1** accumulated in the biomass, and titers reached $> 100 \text{ mg L}^{-1}$.^[16]

Synthetic Routes toward Psilocybin

Along with related tryptamines, **1** was first prepared chemically in the 1950s by Hofmann and co-workers.^[4c,17] Since then, a couple of advances have been published (Scheme 3).

Traditionally, benzyl (Bn)-protected 4-hydroxyindole **19a** was first treated with oxalyl chloride and then with dimethylamine, which led to a dimethylaminooxalyl side chain in the 3-position of the indole nucleus (compound **20a**, Scheme 3a). This step was followed by LiAlH_4 reduction to **21** and finally deprotection to give **2**. Later, Hofmann's procedure^[4c] was optimized (66% overall yields to **2**) by Nichols and Frescas.^[18] In addition, Shirota et al.^[19] replaced **19a** by **19b** to consolidate the reduction and deprotection steps of intermediate **20b** into a single step (Scheme 3, dashed arrow).

An alternative approach to build the side chain was published, by which indole-3-carbaldehyde was used for nucleophilic installation of a nitrile function that was then reduced and dimethylated.^[20] Owing to the use of excess amounts of toxic reagents (thallium salt, cyanides) and low overall economy, this strategy can be considered inappropriate for large-scale synthesis.

The most recent contribution in the field (Scheme 3b) appears convincing with regard to its simplicity and atom and step economy, and it does not produce major quantities of toxic waste. Yields were comparable to those obtained by the traditional route (61% overall to **2**).^[21] Bartolucci et al. succeeded

in attaching a pretailored side chain to the desired position in one step by an iridium-catalyzed borrowing-hydrogen procedure to give formally only water as the byproduct.^[21]

Beyond these methods, **2** was also synthesized by treating *ortho*-iodoanilin (**22**) derivatives with suitable unsaturated precursors.^[22,23] Through this route, the indole core was formed directly by utilizing Pd catalysis (Scheme 3c). Whereas some of these methods still required subsequent multistep modifications on the sidechain,^[22] Gathergood and Scammells accomplished this route via **23** and **24** with the final side chain generated prior to indole ring formation (Scheme 3c).^[23] The yield from **22** to **2** was 24%.

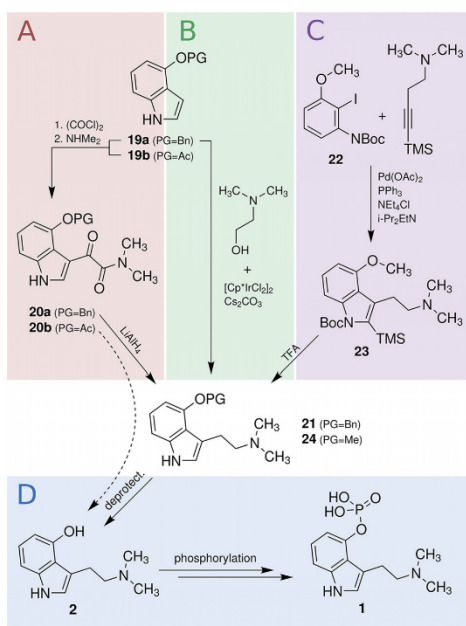
The synthesis of **1** has been completed by phosphate-esterification of **2** (Scheme 3d). This terminal conversion has not yet received as much attention as the other steps, perhaps because **2** represents the actual bioactive compound and the synthesis of **1** requires additional steps. However, the synthesis of **1** as a less redox-sensitive but biocompatible storage form of the active alkaloid has likely been evolved in the biosynthesis to stabilize the fungal product and could serve the same purpose for the pharmaceutical chemist. To date, the most convenient phosphorylation of **2** uses *n*BuLi and tetrabenzylidiphosphate followed by deprotection by Pd-catalyzed hydrogenation,^[19] which lead to **1** in acceptable yields (72% from **2**).

Presently, the demand for **1** for pharmaceutical purposes, that is, produced under current good manufacturing practice (cGMP) conditions for clinical studies, is met by organic synthesis. Currently, the cost to synthesize 1 g of **1** for phase III clinical studies, based on Hofmann's protocol, is estimated to be greater than 2000 USD.

Yet, in vitro biotechnologically produced compounds represent attractive alternatives. Cultures of an engineered fungal microorganism producing **1** can be relatively easily scaled up and grown in large fermenters. Compared with whole-cell catalysis, in vitro catalysis with isolated enzymes is usually advantageous for compound workup owing to a lower background. However, efforts to produce and purify the enzymes need to be taken into account, as well as enzyme stability, solubility, and supply of co-substrates (which in the case of whole-cell catalysis are provided by the host cells). Specific to P_{450} enzymes, electron-transfer partners need to be included in an in vitro approach.

Concluding Remarks: Psilocybin as a Future Therapeutic

The reason to produce—biotechnologically, synthetically, or biosynthetically—a psychotropic compound stems from its (re)discovered therapeutic value. The pharmaceutical usefulness of **1** was recognized soon after its discovery. Initially, synthetic **1** was distributed under the trade name Indocybin Sandoz for psychotherapeutic purposes.^[8a] Moreover, its pharmacology earned **1** both a cult and a stigma. The mushrooms soon developed into a popular recreational drug. Prohibition began in the early 1970s, when **1** became a schedule I compound, according to the UN convention on drugs and similar national legislation in numerous countries.^[24] Being legally



Scheme 3. Synthetic routes toward **2** and **1**. Ac = acetyl, Cp* = pentamethylcyclopentadienyl, Boc = *tert*-butoxycarbonyl, TFA = trifluoroacetic acid.

categorized as a highly addictive drug without medicinal usefulness, research on **1** was essentially abandoned.

Not until one generation of scholars later did research pick up momentum. Renewed interest in **1** as a prodrug of therapeutic agent **2** was accompanied by studies on its relative physiological and psychological safety in controlled and well-defined settings.^[25] Studies showed promising outcomes in the therapy of cancer-related psychiatric distress and anxiety, treatment-resistant depression, and substance addiction.^[26] However, a commonly acknowledged drawback of these studies is the low number of participants due to administrative barriers.^[27] With the aim for the FDA to register **1** as a medication for psychological distress, phase III studies are currently being planned.^[3] US-based nonprofit organizations, such as the Usona Institute in Madison, WI, and the Heffter Research Institute, support and promote research into the future clinical use of **1** on the basis of the highest clinical standards. These initiatives leave us with a cautiously optimistic view that **1** may return to pharmaceutical use in the not-too-distant future.

Acknowledgements

We are grateful to Robert Kargbo (Usona Institute, Madison, WI) for valuable comments on the manuscript. C.L. acknowledges a doctoral fellowship by the International Leibniz Research School (ILRS) for Microbial Interactions. Work in D.H.'s laboratory on psilocybin biosynthesis is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant HO2515/7-1). D.H. is also supported by the Collaborative Research Center ChemBioSys (grant SFB1127) and by the excellence graduate school Jena School for Microbial Communication (JSMC).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: biosynthesis • biotechnology • depression • natural products • psilocybin

- [1] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.
- [2] M. Misiek, D. Hoffmeister, *Planta Med.* **2007**, *73*, 103–115.
- [3] A. M. Sherwood, T. E. Prisinzano, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 1–3.
- [4] a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, *Experientia* **1958**, *14*, 107–109; b) A. Hofmann, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Experientia* **1958**, *14*, 397–399; c) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572; d) A. Y. Leung, A. G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1667–1671; e) C. Lenz, J. Wick, D. Hoffmeister, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2835–2838; f) N. Jensen, J. Gartz, H. Laatsch, *Planta Med.* **2006**, *72*, 665–666.
- [5] R. E. Schultes, *Amer. Anthropol.* **1958**, *14*, 429–443.
- [6] V. P. Wasson, R. G. Wasson, *Mushrooms Russia and History*, Vol. II, Pantheon Books, New York **1996**.
- [7] a) J. Gartz, *J. Basic Microbiol.* **1994**, *34*, 17–22; b) J. Gartz, *Ann. Mus. Civ. Rovereto* **1994**, *10*, 297–305; c) F. Tyts, T. Palenicek, J. Horacek, *Europ. Neuropsychopharm.* **2014**, *24*, 342–356.
- [8] a) T. Passie, J. Seifert, U. Schneider, H. M. Emrich, *Addict. Biol.* **2002**, *7*, 357–364; b) D. J. McKenna, D. B. Repke, S. J. Peroutka, *Neuropsychopharmacology* **1990**, *9*, 193–198.
- [9] A. Brack, A. Hofmann, F. Kalberer, H. Kobel, J. Rutschmann, *Arch. Pharm.* **1961**, *294*, 230–234.
- [10] a) S. Agurell, J. L. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 1210–1218; b) S. Agurell, J. L. Nilsson, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 1063–1064.
- [11] a) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12352–12355; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524–12527; b) H. T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H. B. Korotkin, P. B. Matheny, J. C. Slot, *Evol. Lett.* **2018**, DOI: <https://doi.org/10.1002/evl3.42>.
- [12] F. Blei, F. Baldeweg, J. Fricke, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2018**, <https://doi.org/10.1002/chem.201801047>.
- [13] a) W. Duntze, T. R. Manney, *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 2085–2093; b) H. Zalkin, C. Yanofsky, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1491–1500; c) C. Skrzynia, D. M. Binnering, J. A. Alspaugh, P. J. Pukkila, *Gene* **1989**, *81*, 73–82; M. F. Dunn, D. Niks, H. Ngo, T. R. Barends, I. Schlichting, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 254–264.
- [14] a) R. J. Goss, P. L. Newill, *Chem. Commun.* **2006**, *47*, 4924–4925; b) D. R. Smith, T. Willemse, D. S. Gkotsi, W. Schepens, B. U. Maes, S. Ballet, R. J. Goss, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2622–2625; c) D. Francis, M. Winn, J. Latham, M. F. Greaney, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 382–386; d) M. Herger, P. van Roye, D. K. Romney, S. Brinkmann-Chen, A. R. Buller, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8388–8391.
- [15] J. Gartz, *J. Basic Microbiol.* **1989**, *29*, 347–352.
- [16] S. Hoefgen, J. Lin, J. Fricke, M. Stroe, D. J. Mattern, J. E. Kufs, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, D. Hoffmeister, V. Valiante, *Metab. Eng.* **2018**, *48*, 44–51.
- [17] a) A. Stoll, F. Troxler, J. Peyer, A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1452–1472; b) F. Troxler, F. Seemann, A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2073–2103.
- [18] D. E. Nichols, S. Frescas, *Synthesis* **1999**, *6*, 935–938.
- [19] O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 885–887.
- [20] F. Yamada, M. Tamura, M. Somei, *Heterocycles* **1998**, *49*, 451–457.
- [21] S. Bartolucci, M. Mari, G. Di Gregorio, G. Piersanti, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 2233–2238.
- [22] a) H. Sakagami, K. Ogasawara, *Heterocycles* **1999**, *51*, 1131–1135; b) C. Hu, H. Qin, Y. Cui, Y. Jia, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9075–9080.
- [23] N. Gathergood, P. J. Scammells, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 921–923.
- [24] J. J. H. Rucker, J. Iliff, D. J. Nutt, *Neuropharmacology* **2017**, *117*, 30638–X.
- [25] a) F. Hasler, U. Grimberg, M. A. Benz, T. Huber, F. X. Vollenweider, *Psychopharmacol.* **2004**, *172*, 145–156; b) M. W. Johnson, W. A. Richards, R. R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2008**, *22*, 603–620; c) D. J. Nutt, L. A. King, L. D. Phillips, *Lancet* **2010**, *376*, 1558–1565.
- [26] M. W. Johnson, R. R. Griffiths, *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 734–740.
- [27] D. J. Nutt, L. A. King, D. E. Nichols, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 577–585.

Manuscript received: May 30, 2018

Revised manuscript received: July 13, 2018

Accepted manuscript online: July 16, 2018

Version of record online: November 15, 2018

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten die Biosynthesen mehrerer bisher aus der Pilzgattung *Psilocybe* unbekannte Alkaloide aufgeklärt werden. Da verglichen mit den Bakterien oder Ascomyceten nur sehr wenige Biosynthese-Enzyme aus Basidiomyceten charakterisiert sind, und die vorhandenen Daten aus bakteriellen Arbeiten stammen, waren folgende Biosynthese-Routen noch unentdeckt und die Suche nach diesen gestaltete sich ohne Motive für konservierte Bereiche dementsprechend schwierig. Erschwerend kommt weiterhin die momentan noch fehlende Möglichkeit hinzu, Basidiomyceten genetisch stabil zu transformieren, um unter anderem durch Deletionen von Genen direkt auf ihre Funktion schließen zu können. Dies liegt unter anderem an dem komplexen Aufbau ihrer Zellwandstruktur und dem dikaryotischen Zustand mit zwei Allelen welche deletiert werden müssen, was genetische Manipulationen bisher fast unmöglich macht (Li, Tang et al. 2017).

Im Labor bedeutet das konkret, dass Forscher auf den Nutzen von Heterologen Expressionssystemen wie den genetisch manipulierbaren Modellorganismus *E. coli* angewiesen sind. Durch den Einbau von Genen in diesen Organismus können dessen heterolog hergestellte Proteine gereinigt und enzymatisch charakterisiert werden. Nach erfolgter Charakterisierung der Psilocybin-Biosynthese-Enzyme können nun zukünftig mit diesen Daten weitere nach ähnlichem Prinzip arbeitenden Enzyme annotiert und somit weitere Biosynthese-Wege von Indolalkaloiden innerhalb der Pilze aufgeklärt werden.

Es gelang erstmals die Identifikation weiterer aktiver Wirkstoffe der *Psilocybe* aus der Naturstoffklasse der β -Carboline, welche die Wirkung von Psilocybin auf synergistische Weise verstärken könnten. Diese Entdeckung würde weitreichende Folgen für die klinische Anwendung des Einzelwirkstoffes haben, welcher in Studien bereits erprobt wird.

Die Biosynthese des Psilocybins

Auf der Grundlage der bisher veröffentlichten Daten war von mindestens vier Biosynthese-Enzymen auszugehen. Weiterhin wurde angenommen, dass die Gene dieser in einer für Pilze typischen Anordnung als Gencluster vorliegen, die Gene also innerhalb eines gemeinsamen Locus der DNA akkumuliert sind (Rokas, Wisecaver et al. 2018). Ein typisches Beispiel ist das Gliotoxin Gencluster aus dem pathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus*, welches 13 Gene enthält

(Schrettl, Carberry et al. 2010). Das noch größere Sterigmatocystin Gencluster aus *A. nidulans* enthält sogar erstaunlicherweise 25 Gene (Brown, Yu et al. 1996).

Der Ursprung von Genclustern sind Genduplikationen oder Relokalisationen sowie eine momentan viel diskutierte Hypothese des horizontalen Gentransfers ganzer Cluster (Slot 2017). Gezeigt wurde diese bereits für prominente Beispiele wie Penicillin und Cephalosporin (Gutiérrez, Fierro et al. 1999, Rosewich and Kistler 2000). Nach dieser Hypothese werden vor allem Cluster für Sekundärmetaboliten ursprünglich aus bakteriellen Operons mittels horizontalen Gentransfer in Pilze transferiert. In der Literatur ist eine große Fülle an Veröffentlichungen zu finden, welche die Schlussfolgerung zulassen, dass ein Großteil der pilzlichen Gencluster mittels Relokalisation von bereits existierenden Genen entstanden ist. Reynolds et al. kommt ebenso zu der Schlussfolgerung eines horizontalen Gentransfers des Psilocybin Clusters aus *Fibulorhizoctonia* sp. aufgrund von phylogenetischen Analysen (Reynolds, Vijayakumar et al. 2018). Dies wird unterstützt durch die Tatsache das *Fibulorhizoctonia* sp. Ei-ähnliche Sklerotien produziert welche dann von den Ameisen eingesammelt werden. Als evolutionäre Ursache legt die Arbeitsgruppe eine Strategie der Psilocybin-Produzenten zur Verteidigung der Holz- und Dungsubstrate gegen Insekten mittels der Produktion neurologisch aktiver Wirkstoffe dar. Es gibt allerdings auch Ausnahmen und nicht immer muss die strikte Anordnung eines Biosynthese-Clusters vorliegen.

Es zeigte sich auch, dass ein Großteil der pilzlichen NRPS Gencluster unter Laborbedingungen nicht exprimiert wird, was deren Entdeckung deutlich erschwert. Ein Ansatz ist die Überexpression und Deletion von globalen Regulatoren des Sekundärmetabolismus wie LaeA, durch dessen Manipulation diverse neue Gencluster sowie Metaboliten gefunden wurden (Bok and Keller 2004). LaeA wurde bisher allerdings nur in *A. fumigatus* und weiteren Ascomyceten entdeckt jedoch nicht in Basidiomyceten.

Durch die Einbauversuche mit radioisotopenmarkierten Vorläufern wurde bereits 1968 eine enzymatische Biosynthese-Route (beschrieben in der Einleitung und gezeigt in Abbildung 11) des Psilocybins vorgeschlagen (Agurell and Nilsson 1968, Agurell and Nilsson 1968). Die vorgeschlagene Biosynthese führte in einer schrittweisen enzymatischen Reaktion zur Bildung von Psilocybin. Es war also davon auszugehen, dass mit einer einfachen Standardsuche, welche vor allem nach klassischen Wegen wie einer Produktion durch PKS oder NRPS sucht, die Psilocybin-Biosynthese-Enzyme nicht zu finden sind.

Von den chemischen Reaktionen ausgehend, welche benötigt werden, um die Produktion von Psilocybin zu katalysieren, wurde in dem Cluster das Gen für eine Decarboxylase vermutet, welche die Abspaltung der Carbonsäure unter CO₂-Bildung zu einem Tryptamin katalysiert. Dies muss zwangsläufig einer der frühen Biosynthese-Schritte sein, da die Decarboxylierungs-Reaktion die Möglichkeit zur Ausbildung einer Schiffsschen Base am Amin benötigt, was durch Methylgruppen am Amin verhindert wird. Die Methylierung muss also zwangsläufig nach der Decarboxylierung ablaufen. Spezifisch wurde nach einer aromatischen-L-Aminosäure Decarboxylase (AADC) gesucht, die in der Vergangenheit bereits von Kalb (Kalb, Gressler et al. 2016) aus dem Pilz *Ceriporiopsis subvermispora* charakterisiert wurde. Weitere Arbeiten über die Substratspezifität von aromatischen Aminosäuren stammen aus der dem Schlafmohn *Papaver somniferum* und *Catharanthus roseus* (Torrens-Spence, Lazear et al. 2014).

Weiterhin wurde eine Methyltransferase angenommen, welche schrittweise das Substrat unter Verbrauch des Co-Substrates S-Adenosyl-Methionin (SAM) methyliert. SAM-abhängige Methyltransferasen (MT) katalysieren den Transfer von Methylgruppen von SAM an eine große Vielfalt von Substraten, als Nebenprodukt entsteht S-Adenosyl-Homocystein (SAH). MTs werden schon länger untersucht, vor allem in biomedizinischen Bereichen, wo sie eine Rolle im menschlichen Stoffwechsel spielen. DNA-Methyltransferasen helfen zum Beispiel bei der Steuerung von zellulären Vorgängen wie der DNA Replikation und der post-replikativen Reparatur (Lyko and Brown 2005). Epigenetischen Veränderungen im Methylierungsmuster durch DNA-MT sind vermutlich bei der Entstehung von vielen Krebsarten beteiligt (Jones 2002). In unserem Fall ist für den Übergang der Blut-Hirnschranke des menschlichen Gehirns die Methylierung des Psilocins von Vorteil, was in der Vergangenheit schon an methylierten Derivaten der Phenylethylamine gezeigt wurde (Mosnaim, Hudzik et al. 2014). Konkret wurde für die Anfertigung dieser Doktorarbeit die MT EgtD aus *Mycobacterium smegmatis* als Vorlage verwendet welche den ersten Schritt, die dreifache Methylierung von Histidin, in der Ergothionein Biosynthese katalysiert. Für diese MT gibt es bereits sehr ausführliche Daten zur Struktur und deren Auswirkungen auf die Substrataffinität (Blankenfeldt and Seebeck 2014, Vit, Misson et al. 2015).

Eine weitere enzymatische Reaktion, die rein aus der Struktur des Psilocybins geschlussfolgert wurde, ist die Phosphorylierung des Substrates. Zu den dafür verantwortlichen Enzymen gehören die Kinasen, über deren Mitarbeit an Naturstoffen aus Pilzen nicht viel bekannt ist und deren einzige bekannte Vertreter aus Bakterien stammen. Als Beispiel wären Difficidin

(Struktur gezeigt in Abbildung 7) und Oxydifficidin aus *Bacillus subtilis* (Zimmerman, Schwartz et al. 1987) und Phoslactomycin B aus *Streptomyces* sp. zu nennen (Palaniappan, Kim et al. 2003). Die Gene aller bisher charakterisierten Kinasen im Sekundärstoffwechsel, welche als Suchvorlage im Genom dienen könnten, stammen ausschließlich aus Bakterien, weshalb nur eine geringe Ähnlichkeit zu der pilzlichen Kinase angenommen wird. Ausgehend vom Psilocybin musste weiterhin eine Oxidation des Substrates stattfinden. Aus Basidiomyceten konnten bereits einige Monooxygenasen charakterisiert werden, wie die lytischen-Polysaccharid-Monooxygenasen aus *Phanerochaete chrysosporium* (Wu, Beckham et al. 2013) oder die Cytochrom-P450-Monooxygenasen, welche am Protoilluden Metabolismus in *Postia placenta* beteiligt sind (Ichinose and Kitaoka 2018).

Charakterisierung der Psilocybin-Biosynthese

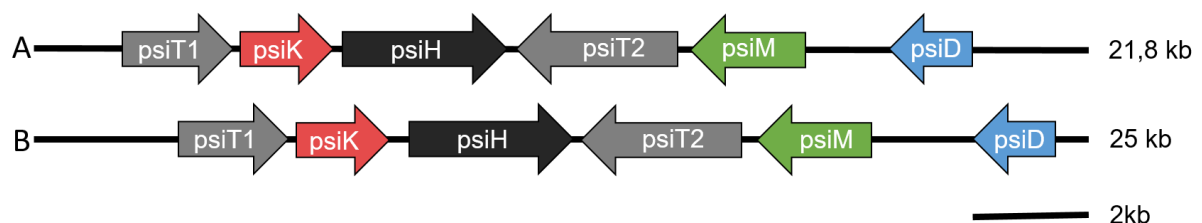


Abbildung 13: Gencluster der Psilocybin-Biosynthese-Enzyme in *P. cyanescens* FSU12416 (A) und *P. cubensis* FSU1408 (B)

Nachdem mögliche Kandidaten-Gene annotiert waren, gelang es, einen Locus zu identifizieren, in dem alle benötigten Gene in einem Abstand von nur 25 kb zueinander lagen. Das vermutete Psilocybin-Cluster ist in Abbildung 13 gezeigt, es enthält die vier bereits angesprochenen benötigten Gene *psiK*, *psiH*, *psiM* und *psiD* in der gleichen Anordnung, sowie zwei Transporter (*psiT1* und *psiT2*). Mittels heterolog hergestellten Proteinen dieses Biosynthese-Clusters konnte erstmalig auf diesem Weg schrittweise Psilocybin produziert werden und der bisher postulierte Biosynthese-Weg korrigiert werden.

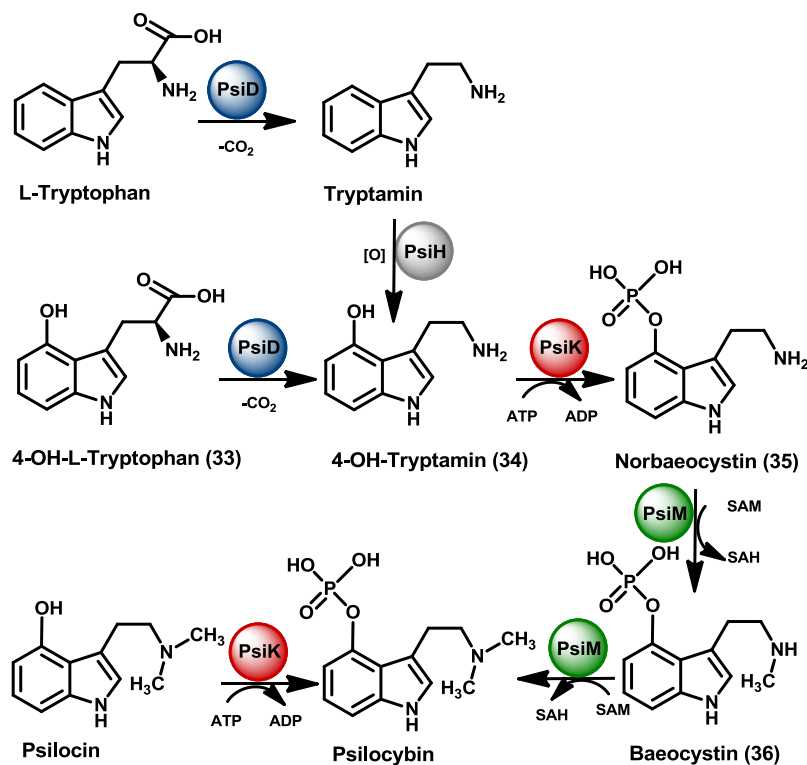


Abbildung 14: Die Biosynthese-Route des Psilocybins und weitere beobachtete Reaktionen

Bei der Charakterisierung der Biosynthese-Enzyme kam es durch strikte Substratspezifitäten vor allem der Methyltransferase zu einer bisher unbeschriebenen Route (Abbildung 14). Die Decarboxylase PsiD zeigt eine hohe Substratflexibilität für L-Tryptophan und **4-Hydroxytryptophan (33)**. Unter den vier Biosynthese-Enzymen war vor allem PsiD unerwartet, da es sich als Enzym aus der Familie der Pyridoxalphosphat (PLP) abhängigen Phosphatidylserine Decarboxylasen (E.C. 4.1.1.28) herausstellte und somit völlig unverwandt zu den pilzlichen aromatischen Aminosäure Decarboxylasen ist. Es gibt noch zwei weitere Klassen von Decarboxylasen, welche mit Thiamindiphosphat oder vollkommen ohne jeglichen Cofaktor auskommen (Arjunan, Umland et al. 1996). Prinzipiell lässt sich verallgemeinern, dass die PLP abhängigen Decarboxylasen fast alle konservierten Bereiche mit dem wesentlich kürzeren Co-Faktor unabhängigen Carboxylasen teilen. Ebenso bisher unbeschrieben ist die Akzeptanz für L-Tryptophan als Substrat in der Familie der PLP abhängigen Phosphatidylserine Decarboxylasen.

Mithilfe des Geneious Tree Builder wurde ein Phylogenybaum erstellt (Veröffentlichung 1: Figure S2, Seite 34), in welchem die Abstammung der *Psilocybe* Decarboxylase PsiD im Vergleich zu anderen pilzlichen, pflanzlichen oder tierischen Decarboxylasen dargestellt ist. Deutlich sichtbar ist der gemeinsame Ursprung beider *Psilocybe* Decarboxylasen, sowie

Fibulorhizoctonia mit der meisten Ähnlichkeit. Hingegen grenzen sich die PLP abhängigen aromatischen Decarboxylasen wie die z.B. von *C. subvermispora* deutlich von PsiD und den Phosphatidylserinabhängigen Decarboxylasen ab.

PsiH, welches eine p450 Monooxygenase ist, zeigte einen Umsatz von Tryptamin zu **4-Hydroxytryptamin (34)**. Rein theoretisch könnte der bisher von Aguerell postulierte Umsatz von Dimethyltryptamin zu Psilocin durch PsiH durchgeführt werden, wird aber schon mechanistisch verhindert durch die strikte Substratspezifität von PsiM. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen die beiden Enzyme PsiD und PsiH die beiden ersten Enzyme in der Abfolge der Psilocybin-Biosynthese sein.

Nur nach erfolgter Decarboxylierung und Hydroxylierung zu 4-Hydroxytryptamin wird das Substrat durch die Kinase PsiK zu **Norbaeocystin (35)** phosphoryliert. PsiK fällt in die Familie der 5-methylribose small-molecule Kinasen. Es zeigte sich eine Substratspezifität für bereits decarboxylierte Substrate wie 4-Hydroxytryptamin oder Psilocin. PsiK ist somit eine der wenigen überhaupt beschriebenen Naturstoff Kinasen neben der für Paeninodine (Zhu, Hegemann et al. 2016) und Calyculin (Wakimoto, Egami et al. 2014). Interessanterweise kommt es auch zu einer schnellen Re-Phosphorylierung von Psilocin zu Psilocybin, wobei es sich um einen Schutzmechanismus des Pilzes handelt, da hier die Stabilität gegen atmosphärische Oxidation im Vergleich zu Psilocin deutlich erhöht wird (Lenz, Wick et al. 2019). Neue Ergebnisse meines Arbeitskollegen Janis Fricke zeigen das die Re-Phosphorylierung von Psilocin zu Psilocybin mit deutlich größerer Wechselzahl Kcat passiert bei gleichbleibenden Km Werten. Dies unterstützt die Theorie der schnellen Re-Phosphorylierung als Schutz vor ungewollter Oxidation. Allerdings verliert Psilocybin dadurch seine pharmakologische Wirksamkeit und wird zur stabilen Prodrug des eigentlichen Wirkstoffes Psilocin.

Die vorhergehende Phosphorylierung zeigte sich essenziell als Voraussetzung für eine Akzeptanz als Substrat durch die SAM-abhängige Methyltransferase PsiM, welche nur einen Umsatz des phosphorylierten Substrates Norbaeocystin zu **Baeocystin (36)** und Psilocybin zeigte. PsiM ist eine Klasse 10 Methyltransferase, welche rein mechanistisch lediglich decarboxylierte Substrate akzeptiert. Dies liegt an der benötigten Ausbildung einer Schiffschen Base für die Decarboxylierung an der Aminogruppe der Ethylamin-Seitenkette. Sind die Substrate bereits methyliert, kann die Schiffsche Base nicht ausgebildet werden und

es kann keine Decarboxylierung solcher Substrate stattfinden. Somit ordnet sich PsiM durch die benötigte Phosphoryloxygruppe als das letzte Enzym der Psilocybin-Biosynthese ein. Durch genau die Substratspezifität für eine Phosphoryloxygruppe wird außerdem verhindert, dass ungewollt das instabile Psilocin aus einer Methylierung von 4-Hydroxytryptamin entstehen kann.

Durch die Charakterisierung der Psilocybin-Biosynthese müssen die von Agurell and Nilsson (Agurell and Nilsson 1968) getroffenen Hypothesen überholt werden. Die Biosynthese konnte nunmehr nach fast 60 Jahren seit der Entdeckung des Moleküls final auf genetischer Ebene charakterisiert werden. Eine weitere Korrektur ist außerdem im Falle des psychotropen Zwischenproduktes Dimethyltryptamin notwendig, welches in sämtlicher Literatur als Zwischenprodukt der Biosynthese genannt wird. Dieses kann jedoch nun definitiv als Teil der Psilocybin-Biosynthese ausgeschlossen werden und weiterhin wurde das Molekül auch durch unsere Analysen nicht in den Extrakten diverser *Psilocybe*-Arten gefunden.

Auch Psilocin kann nicht Bestandteil der Psilocybin Biosynthese sein und bei der Re-phosphorylierung handelt es sich wie angesprochen um eine Schutzfunktion des Pilzes. Dies konnte mittlerweile bestätigt werden (Lenz, Wick et al. 2019). Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der so charakteristischen blauen Verfärbung der Psilocybin-enthaltenden Pilze um eine enzymatische Reaktion auf eine Verletzung handelt. Dazu muss das Psilocybin erst dephosphoryliert werden. Es handelt sich bei der Reaktion von Psilocin zu Psilocybin durch PsiK um einen Mechanismus, der ungewollte unspezifische Dephosphorylierungen wieder rückgängig macht und so eine ungewollte Oxidation von Psilocin unbedingt vermeidet. Die Psilocyl-Radikale haben das Potenzial mit Proteinen in der Zelle zu reagieren und zu vernetzen, was zum Zelltod führt.

In der Literatur gibt es mehrere Beispiele von Sekundärmetaboliten wie dem Hygromycin B, ein Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus*, welches durch eine Phosphorylierung inaktiviert wird und seine biologische Aktivität verliert (Pardo, Malpartida et al. 1985).

Weiterhin handelt es sich bei Mengenangaben von Psilocin als *Psilocybe*-Inhaltsstoff wie in (Gartz 1995) oder (Tylš, Páleníček et al. 2014) vermutlich um Aufreinigungsartefakte und nicht um Bestandteile der Biosynthese. Für die fast vollständige Vermeidung der Entstehung von Psilocin wurde eine wasserfreie Extraktion vorgestellt (Lenz, Wick et al. 2017). Durch das

schnelle Einfrieren der Fruchtkörper wird die enzymatische Aktivität der Psilocybin dephosphorylierenden Enzyme sofort gestoppt und bei gleichzeitiger Gefriertrocknung kann sichergestellt werden, dass dieser Prozess nach Auftauen nicht weiter stattfinden kann.

Im Gegensatz dazu konnten im Zuge der Forschungsarbeiten neue Moleküle gefunden werden. Diese sind das Mono- bzw. Dimethyltryptophan, welche aber aufgrund der strikten Substratspezifitäten der Methyltransferase nicht Bestandteile der Psilocybin-Biosynthese sein können. Dies führte zu der Schlussfolgerung, bei der Extraktion gefundene Metaboliten stets kritisch zu hinterfragen, denn erst durch die Charakterisierung der Enzyme lässt sich eine korrekte Biosynthese postulieren.

Biokatalytische Produktion von Indolalkaloiden aus *Psilocybe* sp.

Der Vorteil enzymatischer Biokatalysatoren ist eine möglichst elegante, effiziente und ökonomische Reaktion, welche verglichen mit der herkömmlichen chemischen Reaktion mit millionenfach erhöhter Reaktionsgeschwindigkeit abläuft (Godfrey and West 1996). Mikrobielle Enzyme sind verglichen mit pflanzlichen oder tierischen wesentlich stabiler und aktiver (Gurung, Ray et al. 2013) und können in kurzer Zeit durch Mikroorganismen in großen Mengen in Bioreaktoren kultiviert werden. Ein weiterer bedeutender Vorteil ist die Möglichkeit der Genmanipulation von Mikroorganismen und die damit einhergehende gezielte Produktion gewünschter Enzyme.

Die Veränderung des endogenen Stoffwechselnetzwerkes eines Organismus für eine biotechnologische Anwendung wird üblicherweise als „metabolic engineering“ bezeichnet. Dabei können unterschiedliche Stufen eingeteilt werden, die sich nach Auswahl der Enzyme und deren eventueller Modifikation richten. Das Ziel ist den metabolischen Fluss von Edukten einer bestimmten Reaktion zu kanalisieren um die Ausbeuten des gewünschten Proteins zu steigern. Eine wichtige Voraussetzung ist ein sequenziertes Genom und die anschließende Kartierung vorliegender Gene und deren Funktionen. Weitere gentechnische Methoden erlauben eine Manipulation natürlich vorliegender Gene, um deren Funktionsmechanismen zu verstehen und zu verändern oder gar in neue Organismen einzubringen. Zum Beispiel können mittels Restriktionsenzyme Gene aus der DNA geschnitten werden und durch Vektoren in neue Organismen eingebracht werden. Die Transformation von filamentösen Pilzen stellt sich jedoch als schwierig, selbst im Vergleich zu *S. cerevisiae*, heraus. Durch die

Nutzung von Protoplasten und erweiterten Methoden wie der Elektroporation konnten mittlerweile für einige filamentöse Pilze erfolgreiche Transformationen gezeigt werden (Ruiz-Díez 2002). Für Pilze ohne eine ausreichende Protoplastenanzahl oder einer fehlenden Regenerativität dieser wurden bereits Agrobakterium-vermittelte Transformationen entwickelt (Michielse, Hooykaas et al. 2005). Für jeden Pilz müssen bereits etablierte Methoden jedoch neu optimiert werden und für die meisten Pilze kommt nur eine spezifische Transformation in Frage (Meyer, Mueller et al. 2003). Es gibt auch bereits erste erfolgreiche CRISPR-Cas9 vermittelte Transformationen, welche den Anschein machen, in Zukunft eine geeignete universelle Methode zur Transformation filamentöser Pilze werden zu können (Zheng, Lin et al. 2017).

Biotechnologische Produktion von Psilocybin, Serotonin und Isonorbaeoystin

Für zukünftige biotechnologische Anwendungen wäre ein hochskalierbarer *in vitro*-Biosyntheseweg mit kontrollierbaren Bedingungen von großem Vorteil. Das bisher in Studien eingesetzte Psilocybin wurde, wie in Publikation 6 vorgestellt, mittels einer mit Nachteilen behafteten chemischen Synthese gewonnen. Mit den neu charakterisierten Biosynthese-Enzymen ist nun eine biotechnologische Lösung möglich, welche jedoch einige Beeinträchtigungen besitzt. Eine der bisherigen Schwachpunkte war die Bereitstellung des hydroxylierten L-Tryptophans als Substrat für die nachfolgenden Enzyme. Aufgrund der vermuteten Lokalisation in der Mitochondrien Membran der Monooxygenase PsiH in *Psilocybe* sp. kann kein lösliches Protein mittels Einbau in *E. coli* heterolog produziert werden. Außerdem besitzen *E. coli* keine Cytochrom C, sondern nutzen drei unterschiedliche Oxidasen, wie Chinol-Oxidasen als Elektronendonator (Theßeling, Rasmussen et al. 2019).

Im folgenden Abschnitt werden die Erweiterungen der natürlichen Biosynthese des Psilocybins unter dem Gesichtspunkt der unterschiedlichen Stufen des „metabolic engineering“ diskutiert. In diesem Fachgebiet werden unterschiedliche Stufen der Konstruktion von Stoffwechselwegen je nach angewandten Methoden unterschieden. Die grundlegendste Form ist die Optimierung bereits existierender Stoffwechselwege im jeweiligen Organismus. Diese Form sieht lediglich eine Deletion oder eine Überexpression von Genen vor.

Auf der nächsten Stufe werden natürlich existierende Stoffwechselwege in biotechnologisch nutzbare Organismen eingebracht. So wurde der Biosynthese-Weg des Psilocybins in den Ascomyceten *A. nidulans* mittels fluoreszenzbasierender Screening Methoden transferiert. Dazu wurde ein Vektor-System entwickelt durch das mehrere Gene unter der Kontrolle von einem Promotor heterolog exprimiert werden können. Mittels integriertem fluoreszierenden Reporter Protein, konnten erfolgreiche Transformierungen durch einfache Fluoreszenz-Mikroskopie identifiziert werden (Hoefgen, Lin et al. 2018).

Mit einer ähnlichen Methodik konnte in der Publikation 1 der Wirkstoff Psilocybin durch eine Verknüpfung von *in vitro/vivo* hergestellten Proteinen durch den Ascomyceten *A. niger* und *E. coli* produziert werden. Dabei wurde die natürlich vorkommende Biosynthese in ihrer Abfolge nicht verändert. Aufgrund der natürlichen Membranbindung der Monooxygenase sowie der fehlenden kompatiblen P450 Reduktase in *E. coli* erfolgte die Produktion in *A. niger*. Die *in vivo*-Herstellung von 4-hydroxylierten Tryptamin durch *A. niger* stellte sich jedoch aufgrund der schlechten Stabilität des Tryptamins als kritischer Punkt heraus. Die benötigte schonende Aufreinigung des Produktes stellte sich als zeit- und kostenaufwändig heraus. In der Publikation von (Lenz, Wick et al. 2019) wird die Vermutung aufgestellt, dass 4-Hydroxytryptamin vor allem durch die fehlende Carboxylgruppe noch anfälliger für Oxidationen ist, was die schlechten Ausbeuten und Probleme bei der Aufreinigung erklärt.

Die Integration der Tryptophansynthase (TS) in die Biosynthese des Psilocybins

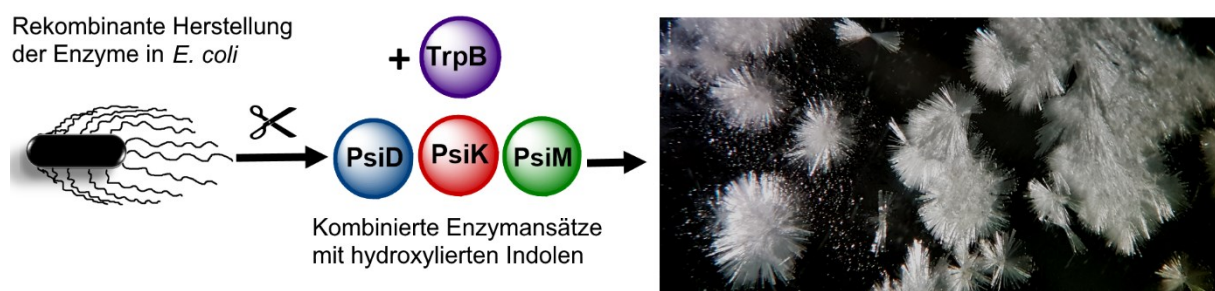


Abbildung 15: Schematische Darstellung der biokatalytischen Herstellung von Psilocybin und einigen Derivaten

Wie im letzten Abschnitt bereits erwähnt, stellte die Bereitstellung des hydroxylierten Substrates für die Biosynthese des Psilocybins den Engpass der Synthese dar. Mit dem Verständnis des bekannten Stoffwechselwegs war der nächste Schritt die Integration der TS aus *P. cubensis*, der ersten TS aus einem Basidiomyceten, welche sich zusätzlich ebenso als flexibel für unterschiedlich substituierte Indole herausgestellt hat (Abbildung 15).

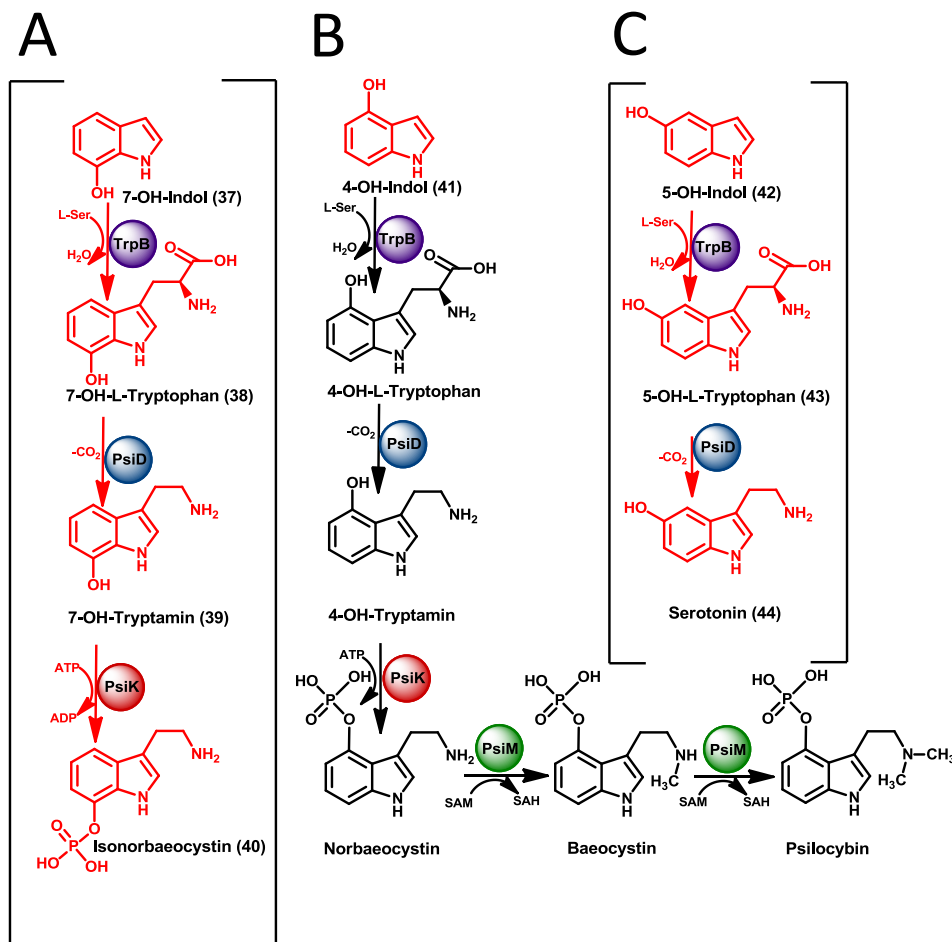


Abbildung 16: Neue Biosynthese-Wege für die erstmalige biotechnologische Herstellung von; A: Isonorbaeocystin, B: Psilocybin und C: Serotonin

Als Ergebnis konnte erstmals eine beliebig skalierbare, durchgehende *in vitro*-Synthese von Psilocybin innerhalb eines einzigen Reaktionsansatzes gezeigt werden (Publikation 2), was somit das erste nicht synthetische oder aus Pilzen extrahierte Psilocybin darstellt. Weiterhin konnte durch die Erweiterung des Biosynthese-Weges die erstmalige biotechnologische Synthese des natürlich vorkommenden Neurotransmitters **Serotonin (44)** nachgewiesen werden. Mit dem gleichen Satz an Enzymen gelang ebenso die Herstellung von **Isonorbaeocystin (40)**, ein synthetisches Derivat der nicht methylierten Psilocybin-Vorstufe. Hier zeigte sich ebenso erneut die postulierte strikte Spezifität von PsiM, welche Isonorbaeocystin nicht als Substrat akzeptierte. Zukünftig könnte mittels einer zielgerichteten Mutation eine spezifische Erweiterung der Akzeptanz von PsiM für weitere Substrate erreicht werden um weitere nicht-natürliche Derivate zu erzeugen.

Die Synthese von Psilocybin, Isonorbaeocystin und Serotonin gelang mittels der Integration der TS in den natürlichen Psilocybin-Stoffwechselweg, unter Verwendung von **4-,5- und 7-Hydroxyindol (41, 42, 37)** statt Indol als Substrat. Mittels der TS erfolgte ein Umsatz zu dem

jeweiligen **4-,5- und 7-Hydroxytryptophan (43, 38)** sowie einer Decarboxylierung zu Serotonin oder **4-, 7-Hydroxytryptamin (39)** durch PsiD. Im Falle des 7-Hydroxytryptamin konnte sogar Isonorbaeocystin erzeugt werden da PsiK eine Substratflexibilität hinsichtlich unterschiedlich hydroxylierter Tryptamine zeigte.

Für die neue *in vitro*-Biokatalyse wurden die Biosynthese-Enzyme aus *Psilocybe* zusammen für eine gemeinsame Reaktion in ein Assay gegeben. Durch die Flexibilität von PsiD für bereits hydroxylierte Substrate konnte somit die PsiH katalysierte Hydroxylierung umgangen werden, was die Anzahl der benötigten Schritte und beteiligten Enzyme reduzierte.

Mit meiner Arbeit konnte erstmals eine Tryptophansynthase aus Basidiomyceten untersucht werden, welche sich grundlegend von den bakteriellen Tryptophansynthasen unterscheidet. Im Unterschied zu den bakteriellen TS, welche immer als $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramere vorliegen, finden sich in Pilzen stets Homodimere aus $\alpha\beta$ -Fusionsproteinen (Pratt and DeMoss 1988, Skrzynia, Binninger et al. 1989). Meine Arbeit konnte den Aufbau pilzlicher TS als Dimere erstmals veröffentlicht aus *S. cerevisiae* bestätigen (Wolf and Hoffmann 1974). Alle bisherigen Daten zu Substratspezifitäten von Tryptophansynthasen stammen hingegen aus bakteriellen Arbeiten, wie *Salmonella enterica* (Goss and Newill 2006, Smith, Willemse et al. 2014).

Durch Kristallstrukturen an bakteriellen Tryptophansynthasen ließen sich die wichtigsten aktiven Zentren bestimmen (Raboni, Bettati et al. 2009). Auch TrpB, die TS aus *Psilocybe*, zeigt die gleichen aktiven Zentren vergleichend mit *A. fumigatus* (AFUA-2G13250). Beide Sequenzen zeigen ein Lysin an Position 87, welches zuständig für die PLP Bindung ist, sowie ein Glutamin an Position 109 als Protonenspende. Ebenso weisen beide Sequenzen ein Arginin an Position 141 und die Asparaginsäure an Position 305 auf, welche zuständig für die Salzbrückenbildung und somit für den auf/zu Zustand des Enzyms verantwortlich sind. Zugleich zeigte sich eine Mutation im Lysin an Position 170, welche wichtig für die Kanalbildung der Indol-Ausschleusung ist. Es wird deutlich, dass die beiden Sequenzen sehr konservierte Bereiche besitzen, und sich die aktiven Zentren mit denen bakterieller Tryptophansynthasen gleichen. Zur Bestätigung wurde dafür eine Punktmutation am aktiven Zentrum des Codons des Glutamins an Position 109 eingeführt, dessen Funktion wichtig für die Dehydrierung zum Aminoacrylat ist. Die Mutation inaktivierte die Enzymaktivität der TS, was den generellen Aufbau der TS mit ihrem aktiven Zentrum an Position 109, wichtig für die Dehydrierung zum Aminoacrylat, bestätigte (Dunn, Nicks et al. 2008).

Verglichen mit der TS aus *Salmonella* zeigte die TS aus *Psilocybe* unterschiedliche Substratspezifitäten: An Position 4- und 7 hydroxylierten Indole wurden umgesetzt. Anderweitig substituierte Indole wurden durch die TS aus *Psilocybe* als Substrat nur schlecht akzeptiert. Die aus *Salmonella* stammende TS zeigte einen deutlich besseren Umsatz für Position 4 hydroxylierten Indole. Dadurch eignete sich die TS aus *Psilocybe* besonders für die Integration in die Biosynthese des Psilocybins. Es konnte erstmalig eine Methode zur durchgehenden *in vitro*-Synthese von Psilocybin in einem Reaktionsansatz ausgehend von hydroxylierten Indol veröffentlicht werden und damit auch die Kosten durch die Benutzung von günstigeren Ausgangssubstraten gesenkt werden.

Durch die Flexibilität der TS und der darauffolgenden Enzyme konnte ebenso der Neurotransmitter Serotonin und weitere Derivate hergestellt werden. Die bisher noch unbeachtete Erzeugung von substituierten Tryptophanen vor allem durch die β -Untereinheit zeigte sich als nützlich zur Erzeugung halogenierter Derivate des L-Tryptophans. Dabei werden die entsprechenden substituierten Indole gefüttert, oder β -methyliertes Tryptophan durch die Verwendung von L-Threonin anstelle von L-Serin (Goss, Pubill-Ulldemolins et al. 2019) mittels einer Kombination unterschiedlicher biotechnologischer Methoden erreicht und ermöglicht ebenso die flexible Herstellung von substituiertem L-Tryptophan.

Methode	Vorteile	Nachteile
<i>In vivo</i>- Biokatalyse Psilocybin	<ul style="list-style-type: none"> - Zugabe von kostenintensiven Co-Substraten wie ATP entfällt - Regioselektivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Komplizierte und große gentechnische Anlagen notwendig - Aufwändigere mehrstufige Aufreinigung des Metaboliten
<i>In vitro</i>- Biokatalyse Psilocybin	<ul style="list-style-type: none"> - Gute Skalierbarkeit - Flexible Derivate mit einem Satz an Enzymen - Regioselektivität - Besser Isolation der Metaboliten aus wässrigem Extrakt 	<ul style="list-style-type: none"> - Zugabe von Co-Substraten notwendig - Haltbarkeit der Enzyme
Chemische Synthese z.B. nach Hofmann	<ul style="list-style-type: none"> - Höhere Anzahl von Derivaten möglich - Einfache Maßstabsvergrößerung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - Verwendung von toxischen Schwermetallen - keine Regioselektivität

Tabelle 1: Vergleich der unterschiedlichen Methoden der Psilocybin-Herstellung hinsichtlich Vor- und Nachteile

Die vorgestellte neue *in vitro*-Biosynthese erlaubt eine schnellere Reaktionskinetik und eine beliebige Skalierbarkeit der Reaktion. Durch die flexible Produktion von Derivaten ist diese Biokatalyse in der Lage völlig neue nicht-natürliche Stoffwechselprodukte wie Isonorbaeocystin zu erzeugen. Die großen Vorteile der *in vivo*-Biokatalyse liegen in der Regioselektivität, welche vor allem bei der spezifischen Hydroxylierung an der Position 4 des Indolrings notwendig ist. Speziell dieser Schritt ist schwer mittels der chemischen Synthese nachzuvollziehen. Dies gilt ebenso für die anschließende nicht triviale Phosphorylierung mit Ausbeuten unter 20 % für diesen Schritt unter Verwendung der Methode von (Hofmann, Frey et al. 1958). Gerade an diesem Punkt kann die Biokatalyse erneut ihre Vorteile ausspielen, und PsiK kann Psilocin mit deutlich höheren Ausbeuten zu Psilocybin phosphorylieren.

Durch eine nochmalige Erweiterung der Biosynthese mittels der Enzyme Adenin-Desaminase und S-Adenosylhomocystein-Nukleosidase gelang es, die auftretende Produkt- Inhibition bei der Methylierung des Substrates aufzuheben. Durch die Wiederherstellung der Enzymkinetiken konnte eine effektivere Co-Faktor Nutzung des eingesetzten SAM erreicht werden. Dadurch konnte ebenso in Spuren eine dreifache Methylierung, also Quartärnisierung des Psilocybins zum Molekül Aeruginascin beobachtet werden. Gestützt durch dieses Ergebnis vermuten wir dieses Auftreten in *Inocybe aeruginescens*, durch eine erhöhte Substratspezifität der Methyltransferase oder einem verbesserten Abtransport des inhibierenden SAH. Eine weitere Möglichkeit ist eine höhere Affinität der Methyltransferase

zum mehrfach methylierten Substrat, da TrpM das Substrat zwischen den Methylierungsschritten nicht aus dem Enzymkomplex entlässt. Durch die Erweiterung der Assays um die Enzyme Desaminase und Nucleosidase konnte eine Effektivierung des letzten Schrittes der Psilocybin-Biosynthese erreicht werden. Der so geschaffene Biosyntheseweg konnte unter Verwendung der TS durch das Beseitigen des akkumulierten verbrauchten Co-Faktors SAH nochmals deutlich verbessert werden. (Blei, Fricke et al. 2018) Die Verbesserung des Umsatzes, durch die gezielte Kombination mit der Desaminase und Nucleosidase, konnte in der Vergangenheit bereits bei der Methylierungsreaktion von Histidin durch EgtD gezeigt werden (Vit, Misson et al. 2015).

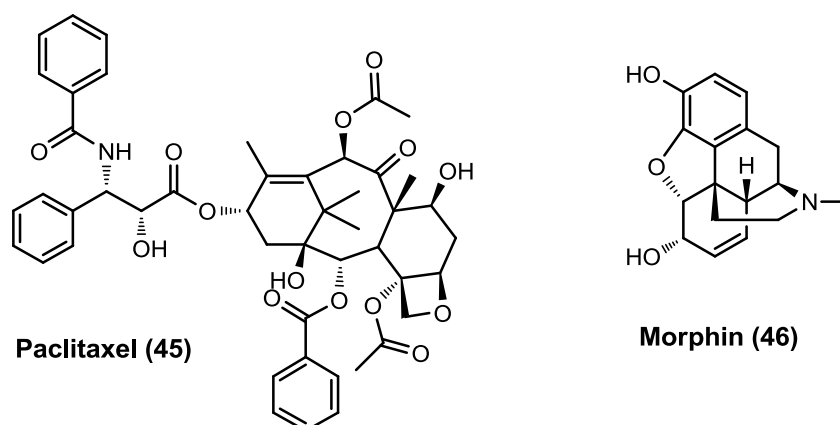


Abbildung 17: Die Strukturformeln des Morphins aus *Papaver somniferum* und Paclitaxel aus *Taxus brevifolia*

Im Kontext zu den neu entwickelten Biokatalysen des Psilocybins steht die Produktion von anderen Naturstoffen wie des **Morphins (46)**, welches bereits über eine Totalsynthese produziert werden kann (Uchida, Yokoshima et al. 2006), aber das bisher für klinische Anwendungen immer noch aus den Kapseln von *Papaver somniferum* gewonnen wird (Matyášová, Novak et al. 2011). Der große Nachteil dabei ist der erforderliche kostenintensive Anbau des Schlafmohns im Vergleich zu anderen Stoffen, welche im Labor komplett chemisch synthetisiert werden können. Ein weiteres Beispiel aus diesem Gebiet ist die Partialsynthese von **Paclitaxel (45)**, einem Wirkstoff aus *Taxus brevifolia*, welcher erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt wird. Aufgrund des langsamen Wachstums von Eiben musste jedoch auf eine Partialsynthese des Wirkstoffes umgestellt werden (Li, Zhang et al. 2014) und der Vorläufer Taxadien durch den Mikroorganismus *E. coli* produziert werden. In der Vergangenheit wurde ebenso versucht, eine biotechnologische Produktion von Artemisinin zu etablieren, denn die Versorgung mit diesem Malariamedikament aus der Pflanze *Artemisia annua* unterlag großen Schwankungen. Schrittweise gelang es die Produktion des Vorläufers Artemisininsäure sowie Amorphadiene in der Hefe *S. cerevisiae* und somit eine

semi-synthetischen Herstellung zu etablieren (Westfall, Pitera et al. 2012). Die Methode konnte durch weitere Verbesserungen bis zu einer Produktion von 25 g Artemisininsäure pro Liter gesteigert werden und eine einfache chemische Reaktion zu Artemisinin entwickelt werden (Paddon, Westfall et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte kürzlich die komplette Biosynthese von verschiedenen natürlich vorkommenden Cannabinoiden aus dem einfachen Zucker Galactose in der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden. Durch eine Fütterung der Hefe mit verschiedenen Fettsäuren konnten ebenso erstmals nicht-natürliche Derivate hergestellt werden (Luo, Reiter et al. 2019).

Biotechnologische Herstellung von 6-Methyl-Psilocybin und Baeocystin

Im Rahmen der Zielsetzung meiner Arbeit konnte mittels der bereits angesprochenen TS aus *S. enterica* ein an Position 6 methyliertes Baeocystin und Psilocybin hergestellt werden. Explizit wurde diese TS gewählt, weil sie in vorhergehenden Veröffentlichungen (Goss and Newill 2006) eine breite Akzeptanz für C6-substituierte Indole gezeigt hat. Die Integration in die Psilocybin-Biokatalyse zeigte sich als erfolgreich. Beide vorgestellten Biosynthese-Routen nutzen ebenso die Erweiterung durch die SAH-Nucleosidase und Adenin-Desaminase, welche SAH als zweites Reaktionsprodukt entfernen, um eine Produkthemmung durch dessen Ansammlung zu verhindern.

Weitere nicht-natürliche Derivate des Psilocybins könnten in der Zukunft wichtige Therapeutika darstellen und eine Erweiterung der Biosynthese-Route des Psilocybins stellt eine Grundlage für deren Herstellung dar. Da Psilocin wie in der Einleitung mit mehreren Rezeptoren interagiert, bieten Derivate des Psilocins die Möglichkeit von veränderten oder verschobenen Affinitäten hin zu anderen Rezeptoren, sowie eine veränderte Pharmakokinetik. Ein gutes Beispiel sind Pyridopyrimidinon Derivate, welche zur Behandlung von Schizophrenie gezielt an eine gleichzeitige Affinität für Dopamin-D₂ und 5-HT_{2A}-Rezeptoren entwickelt wurden (Zhang, Li et al. 2019). Die Studien legen durch Strukturveränderungen umgewandelte Wasserstoffbrückenbindungen sowie elektrostatische und hydrophobe Interaktionen mit den Rezeptoren, welche für eine stabile Bindung benötigt werden, als Grundlage dar. Es konnten die Codons für Asp114, Trp100, Phe389 des Dopamin D₂ Rezeptors sowie Asp134, Phe328, Trp324 des Serotonin-5-HT_{2A} Rezeptors als wichtige Bindestellen ermittelt werden. Mit diesen Daten können gezielt auch Analoge des Psilocybins in Simulationen getestet und mittels geeigneter Enzymsätze biotechnologisch hergestellt

werden. In der Zukunft könnten so Analoge des Psilocybins für den medizinischen Einsatz entwickelt werden, um mit veränderten Rezeptor-Affinitäten gezielt gewünschte Wirkungen zu erhalten.

Die für medizinische Anwendungen aktuell eingesetzten Naturstoffe sind nicht einheitlicher Herkunft: Ein Beispiel ist Erythromycin, welches immer noch z.B. aus der Kultur von *Saccharopolyspora erythraea* gewonnen wird. Für die biotechnologischen Anwendungen wurden durch genetische Änderungen am Organismus die Produktion von Erythromycin optimiert (Wu, Zhang et al. 2011). Ähnlich verlässt sich die pharmazeutische Industrie auch im Fall von Penicillin G ebenso noch auf eine Produktion durch Mikroorganismen wie *Penicillium chrysogenum* oder setzt auf Partial-Synthesen (Mahajan and Balachandran 2012).

Eine Erweiterung der Substrat-Spezifitäten, vor allem der Methyltransferase, würde die Tür zur biotechnologischen Produktion von einer großen Bandbreite an Derivaten des Psilocybins öffnen, für welche momentan noch keine chemischen Synthesen verfügbar sind oder deutlich effektiver sind. Für die Erweiterung der Substrat-Spezifitäten würde sich Röntgen-Kristallstrukturanalysen der Biosyntheseenzyme anbieten, mit deren Daten und zielgerichteten Mutationen die Spezifitäten vergrößert oder verschoben werden können (Steffen-Munsberg, Vickers et al. 2013). Weiterhin können mit einem einzigen Satz an Enzymen mehrere Derivate hergestellt werden. Pharmazeutisch gesehen sind wirkverstärkende oder-verlängernde Halogenierungen des Psilocybins interessant (Lu, Shi et al. 2009, Xu, Yang et al. 2014). Dies wurde bereits durch die stark gesteigerte Affinität der Pyridine enthaltenden Antagonisten zu dem nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor $\alpha 4\beta 2$ gezeigt (Rohde, Ahring et al. 2012). Ebenso zeigte eine Halogenierung von Phenothiazine und Benzopyranol-Analogen eine gesteigerte Membranbindung und Durchdringung der halogenierten Wirkstoffe (Gerebtzoff, Li-Blatter et al. 2004). Eine Steigerung ist diesbezüglich nur noch durch die Konstruktion völlig neuer Enzyme oder durch den Einsatz weiterer modifizierter Enzyme im Biosyntheseweg möglich, mit dem Ziel, die Grenzen der Natur zu übersteigen und die höchstentwickelten synthetischen Stoffwechselwege zu erschaffen (Erb, Jones et al. 2017).

Untersuchungen zur L-Tryptophan-Methyltransferase

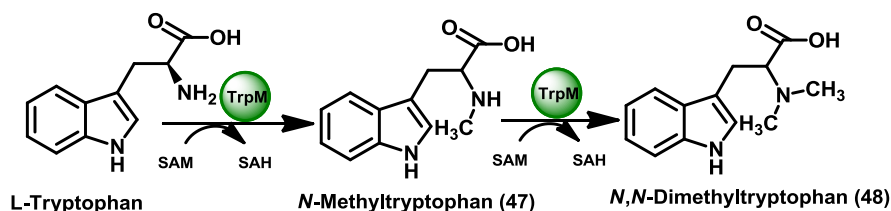


Abbildung 18: Schrittweise Methylierung von Tryptophan mittels TrpM

Bereits während der Arbeiten zur Psilocybin-Biosynthese konnte in den Extrakten **einfach** oder **doppelt methyliertes L-Tryptophan (47, 48)** identifiziert werden. Durch die bereits erwähnten Substratspezifitäten konnte PsiM nicht dafür verantwortlich sein und die bereits publizierte MT EgtD (Vit, Misson et al. 2015) legte ebenso eine ähnliche und PsiM unabhängige Methylierung von L-Tryptophan nahe. EgtD ist Teil der Ergothioneine-Biosynthese verschiedener Pilze und spielt eine Rolle in Zellulären Redox-Prozessen (Vit, Misson et al. 2015). Mittels erneuter Suche konnte in den Genomdaten das Gen *trpM* gefunden werden, welches eine zweite SAM-abhängige Methyltransferase im Genom von *Psilocybe* codiert. Eine anschließende Charakterisierung der Substrat-Spezifitäten ergab, das TrpM lediglich einen Umsatz von L-Tryptophan nicht jedoch von Tryptamin zeigte. Eine Methylierung von Tryptamin und eine anschließende Hydroxylierung durch PsiH könnte ebenso die Entstehung des instabilen Psilocin begünstigen. Durch die Substratspezifität von TrpM kann eine Überkreuzung beider Biosynthesen ausgeschlossen werden und ebenso eine ungewollte Entstehung von Psilocin aus der Methylierung von 4-Hydroxytryptamin. Weiterhin wird durch eine Methylierung des Substrates L-Tryptophan eine anschließende Decarboxylierung aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Ausbildung einer Schiffsbasis am Amin ausgeschlossen.

Durch eine erweiterte Biosynthese mittels der Enzyme Adenin Desaminase und S-Adenosylhomocystein Nukleosidase gelang es erstmalig eine biokatalytische Route für die Produktion des Indolalkaloides **L-Hypaphorin (50)** zu entwickeln. Dies hat vor allem eine ökologische Relevanz, da L-Hypaphorin als funktionelles Analogon des durch Bäume sekretierten Phytohormons Indol-3-pyruvat agiert, was eine wichtige Rolle bei Interaktionen von Mykorrhizapilzen mit Bäumen spielt (Ozawa, Honda et al. 2008). Auch wenn die Pilze aus der Gattung der *Psilocybe* Saprobionten sind, scheint auch ohne diese Interaktion genügend evolutionärer Druck zur Bildung von L-Hypaphorin in der Natur zu herrschen, oder

vielleicht ein anderer Grund zur Produktion vorliegen. Bekannt wurde L-Hypaphorin durch die Produktion durch Pflanzen der Familie der *Leguminosae* und zeigte in Versuchen eine schlafinduzierende und verlängernde Wirkung (Ozawa, Honda et al. 2008).

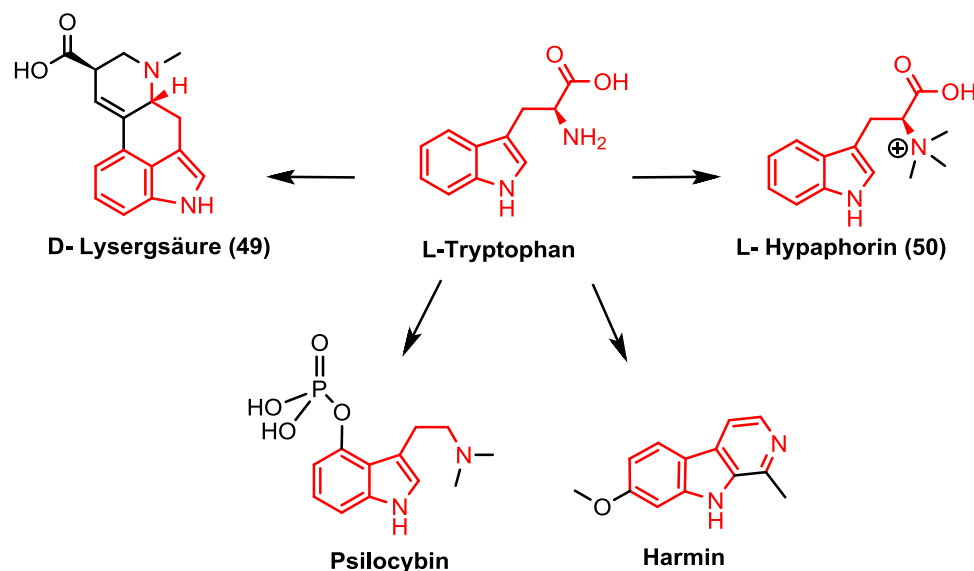


Abbildung 19: ein gemeinsamer Vorläufer für die Produktion unterschiedlicher Indolalkaloide aus Pilzen

Jedoch stammen die Substrate der Methyltransferasen PsiM und TrpM aus den gleichen Vorläufern und beide könnten um den gleichen Pool konkurrieren, je nach Regulation der Biosynthesen oder einer räumlichen Trennung der Synthesen. Im Fall der *Psilocybe* Pilze benötigt PsiM immer eine vorausgehende Phosphorylierung des Substrates, währenddessen nur ein Umsatz von L-Tryptophan durch TrpM beobachtet wurde. Sobald die Carboxylgruppe des L-Tryptophans entfernt oder eine Hydroxylgruppe hinzugefügt wurde, zeigte sich kein Enzymumsatz durch TrpM.

Ein prominentes vergleichbares Beispiel aus dem Reich der Pilze sind die Ergolin-Alkaloide, wie die **D-Lysergsäure (49)** dem LSD Vorläufer aus der Familie der *Clavicipitaceae*, deren zahlreiche Derivate wie die gefunden Alkaloide aus *Psilocybe* von dem gemeinsamen Substrat L-Tryptophan ausgehen (Abbildung 19). Die Biosynthese-Wege der Ergolin-Alkaloide variieren dabei von simplen Transformationen vom prenylierten L-Tryptophan zu trizyklischen und tetrazyklischen Clavinen bis zum Einbau von D-Lysergsäure in komplizierten Anordnungen zu Oligomeren, wie Ergonovin oder den Ergopeptinen (Florea, Panaccione et al. 2017).

Weitere aus L-Tryptophan aufgebaute pilzliche Naturstoffe sind die β -Carboline, zu denen das in der Abbildung 19 gezeigte Harmin gehört. Der nächste Abschnitt beschäftigt sich mit der Entdeckung dieser Naturstoffklasse in den Pilzen der Gattung *Psilocybe*.

Analyse von β -Carbolenen in den Extrakten von *Psilocybe* sp.

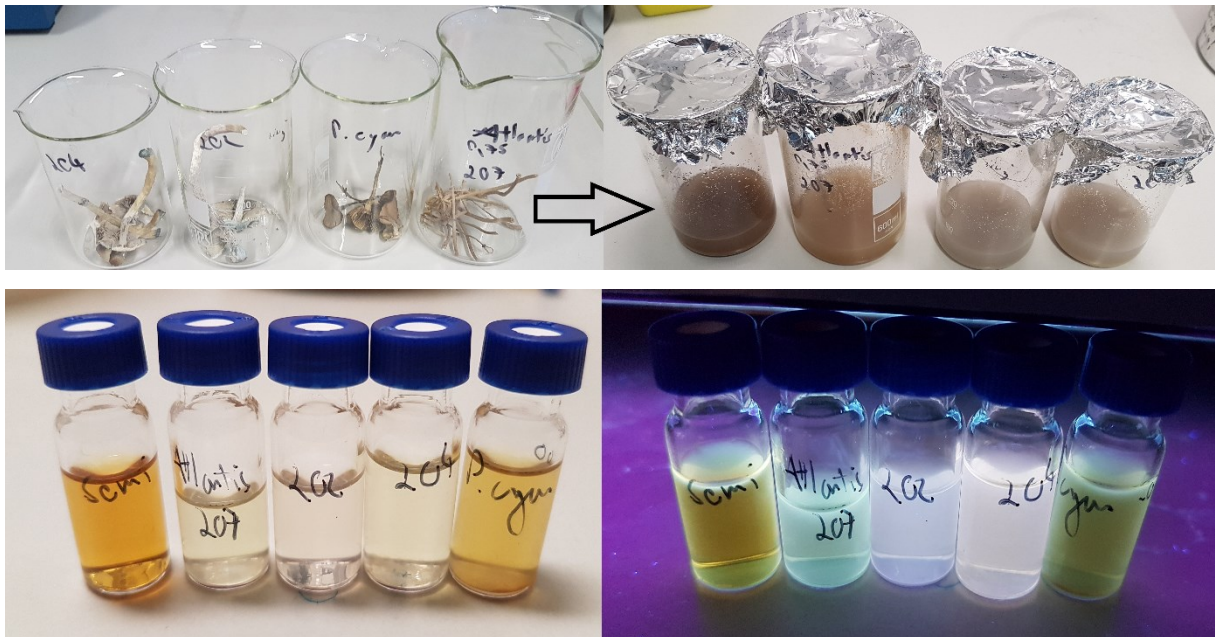


Abbildung 20: Oben; Extraktion von *P. cubensis*, *P. cyanescens*, *P. semilanceata* und *P. mexicana* Arten, Unten: Fluoreszenz der der aufgereinigten Säure/Basen Extrakte der unterschiedlichen Fruchtkörper der *Psilocybe* Arten unter Licht mit einer Wellenlänge von 365nm (Schwarzlicht)

Detaillierte Untersuchungen von weiteren Indolalkaloiden in den Extrakten aus *Psilocybe* sp. führten auf die Spur der β -Carboline. Durch eine Fütterung von *P. mexicana* Myzel mit $^{13}\text{C}_{11}$ -L-Tryptophan konnte der Einbau dieses schwereren isotope markierten L-Tryptophans in Harman und Harmin nachgewiesen werden. Durch den Einbau konnten außerdem weitere Derivate wie Norharman, Harmol, Perlolyrin und Cordysin C/D (Strukturformeln sichtbar in Abbildung 21) ermittelt werden. Durch diese wichtige Bestätigung konnten die gefundenen β -Carboline als direkte Biosynthese-Produkte der Pilze identifiziert werden und eine mögliche Artefaktbildung bei simplen β -Carbolenen ausgeschlossen werden (Allen and Holmstedt 1980). Weiterhin bestätigt dies die Annahme, dass die Biosynthesen der gefundenen β -Carboline ebenso wie auch Psilocybin von L-Tryptophan ausgehen. In der Vergangenheit gelang bereits eine Identifikation diverser β -Carboline aus dem Basidiomyceten *Hygrophorus eburneus* sowie *hyacinthinus* (Teichert, Lübken et al. 2008). Weitere β -Carboline wie das Infractopicrin konnten in den Pilzen *Cortinarius infractus* entdeckt werden (Brondz and Høiland 2009), sowie 6-Hydroxymetatacarboline D aus *Mycena metata* (Jaeger, Lamshöft et al. 2013).

Ökologische Bedeutung der gefundenen MAO-Inhibitoren aus *Psilocybe* sp.

Interessanterweise kam es bei den untersuchten *Psilocybe*-Arten zu unterschiedlichen Profilen gefundener β -Carboline Derivate und wild gewachsene Pilze wiesen deutliche Unterschiede auf. Die Fruchtkörper der wilden gesammelten Pilze *P. cyanescens* sowie *P. semilanceata* zeigten eine größere Anzahl an verschiedenen β -Carbolin-Derivaten. Da die beiden Pilzarten im Labor keine Fruchtkörper ausbilden und diese nur wild gefunden werden, konnte leider nicht geklärt werden, ob das Substrat oder andere Umwelteinflüsse eine Rolle spielen könnten. Dies ist insofern eine sehr interessante Entdeckung, als dass viele β -Carboline eine biologische Aktivität aufweisen, welche auf einer selektiven Interaktion mit spezifischen Enzymen beruht. Die Monoaminoxidase A (MAO_A) katalysiert die oxidative Desaminierung vor allem von Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und vielen weiteren Botenstoffen außerhalb des Gehirns, wohingegen die Monoaminoxidase B (MAO_B) primär im Gehirn vorkommt und für den Dopamin-Abbau zuständig ist (Gaweska and Fitzpatrick 2011).

Die MAO_A ist ebenso für den Abbau von Psilocybin zu 4-Hydroxyindol-3-yl-Acetaldehyd zuständig und eine Hemmung dieses Enzyms würde zu einer verstärkten und verlängerten Wirkung durch das nicht abgebaute Psilocybin führen. In der Vergangenheit zeigte Harmin eine K_i für die Hemmung von MAO_A von 5 nM (Kim, Sablin et al. 1997). Eine Studie an Lebensmitteln zeigte Konzentrationen von 100-600 ng/g Harman in den Extrakten von Rosinen, welche eine inhibitorische Wirkung der MAO_A aufzeigen konnten (Herraiz 2007). In den Mycelien von *P. mexicana* konnten Konzentrationen bis zu 21 μ g/g Biomasse gemessen werden. Verglichen damit konnten in den Fruchtkörpern jedoch nur bedeutend geringere Mengen von knapp einem Prozent bis zu 7,1 % in den Sklerotien bezogen auf die Myzelproben bestätigt werden. Jedoch könnten schon die geringe Menge der β -Carboline, welche in den Fruchtkörpern und Mycelien gemessen wurden, für einen schnelleren Wirkeintritt bis zu einer deutlich gesteigerten Intensität oder Dauer der psychotropen Wirkung sorgen (Van Amsterdam, Opperhuizen et al. 2011).

In Holland werden Trüffel diverser *Psilocybe* Arten in sogenannten Smartshops mit unterschiedlichen Kategorien beworben, welche sich stark in der Wirkung hinsichtlich Wahrnehmung, Kreativität sowie Denkfähigkeit unterscheiden. Die in *Psilocybe* gefundenen β -Carboline könnten also definitiv einen Einfluss auf die Wirkung des Psilocins haben. Anhand dieser Tatsache kann *a priori* angenommen werden, dass reines Psilocin ohne die

synergistische Wirkung der β -Carboline deutlich kürzer wirken würde, wohingegen die Wirkung von Psilocin mit gezielter Gabe von β -Carbolen verlängert werden könnte. Außerdem stellen unsere Messungen lediglich eine kurze Momentaufnahme im Leben der Pilze dar, und vielleicht fehlt noch der richtige Trigger oder Substrat um die Produktion der β -Carboline zu steigern.

Das Grundprinzip der synergistischen Wirkung der Harman-Alkaloide zusammen mit den Indol-Alkaloiden, wird von den indigenen Völkern Südamerikas schon seit vielen tausend Jahren genutzt. Die kulturelle Zubereitung Namens Ayahuasca erfolgt mittels einer Mischung aus Dimethyltryptaminhaltigen Pflanzen (traditionell *Psychotria viridis*) welche zusammen mit der Harman-Alkaloiden enthaltenen Liane *Banisteriopsis caapi* gekocht werden. In Studien konnte auch eine antidepressive Wirkung durch z.B. Harmin nachgewiesen werden (Fortunato, Réus et al. 2009). Die Hinweise zum Konsum von *Psilocybe*-Pilzen zusammen mit diesen Alkaloiden sind rar. Unter anderem lassen sich zu dem Namen „Psilohuasca“ in einem Buch mit schamanistischen Anleitungen Nachweise zum Konsum von Fruchtkörpern der *Psilocybe* sp. zusammen mit *Peganum harmala* oder anderen β -Carboline-haltigen Pflanzen finden. Laut Buch sollen schon bereits 1 g getrocknetes Samenmaterial von *P. harmala* die Wirkung des Psilocins potenzieren und wird als vollwertiges Ayahuasca-Analog beschrieben (DeKorne 1995). In der Literatur wird der Gehalt der Samen mit 1,84 % Harmin und 0,16 % Harman beschrieben, sowie mit 0,25 % Harmalin und 3,9 % Harmalol. Dies entspräche 18 mg Harmin sowie 1,6 mg Harman in einem Gramm trockenen Samenmaterial (Hemmateenejad, Abbaspour et al. 2006). Vor allem Harman und Harmin sind starke reversible Inhibitoren der MAO_A aus Säugetiergehirnen und Leber mit einer K_i von 8,9 nm bzw. 9,9 nm (Miralles, Esteban et al. 2005). Durch die synergistische Wirkweise könnten die β -Carboline in *Psilocybe* trotz der geringen Konzentrationen zu einem relevanten Effekt beitragen. Inwiefern genau die gefundenen β -Carboline zu den bereits bekannten Wirkungen der psychedelischen Pilze beisteuern, müssen aber weitere Forschungen zeigen.

Biosynthese der β -Carboline

Durch Fütterung von in Flüssigkultur gewachsenen Myzels von *Psilocybe* sp. mit markierten L-Tryptophan konnte die Produktion von weiteren Derivaten wie Perlolyrin und Cordysinin C/D bestätigt werden und eine Artefaktbildung bei der Extraktion ausgeschlossen werden.

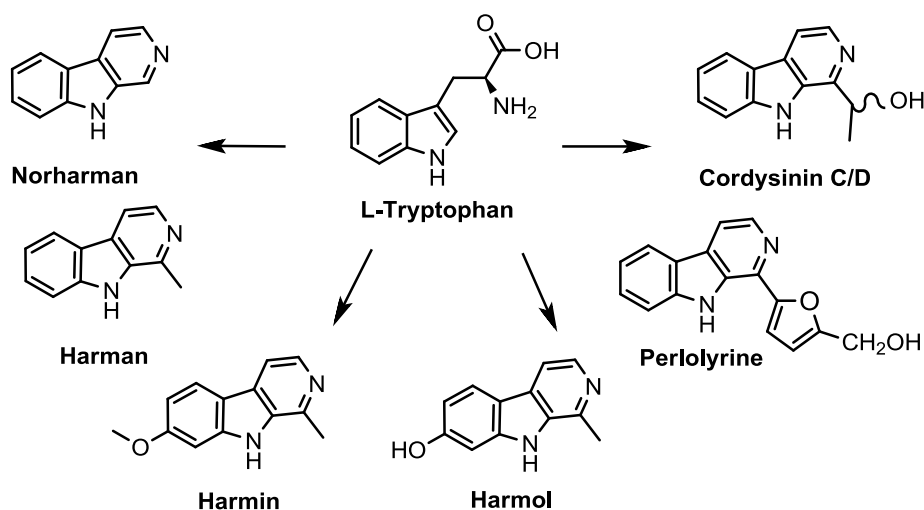


Abbildung 21: In *Psilocybe* sp. gefundene β -Carboline

Perlolyrin ist als Alkaloid aus der Pflanze *Codonopsis pilosula* geläufig (Liu, Liang et al. 1988). Cordysinin C/D hingegen ist aus den „Heilpilzen“ *Ophiocordyceps sinensis* bekannt und zeigte in Studien ebenso entzündungshemmende Eigenschaften (Yang, Kuo et al. 2011). Dadurch bestätigt sich die Annahme, dass die β -Carboline ebenso wie das Lysergsäureamid aus der Aminosäure L-Tryptophan aufgebaut werden (siehe Abbildung 21). LSA wird durch endophytische Pilze, welche zusammen mit *Ipomea*-Arten leben, produziert (Kucht, Groß et al. 2004). In allen untersuchten *Psilocybe*-Arten, sowie in den mono- und dikaroytischen Mycelien, Sklerotien und Fruchtkörpern, konnten verschiedene β -Carboline nachgewiesen werden. Harman-Alkaloide wurden auch in den Guttationstropfen von *P. cubensis* Mycelkulturen gefunden. Im Gegensatz dazu konnte keine in das Medium abgegebenen Alkaloide bei Flüssigkulturen nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sowohl Psilocybin als auch β -Carboline beide aus L-Tryptophan aufgebaut sind, und diese Naturstoffe mittels unterschiedlicher Pfade produzieren, welche jedoch mit ihren synergistischen Wirkungen zur gleichen Pharmakologie beitragen.

Auch im Fall der β -Carboline wurde versucht, die Biosynthese dieser zu charakterisieren. Wir vermuteten verschiedene enzymatisch katalysierte *Pictet-Spengler*-Reaktionen hinter der gefundenen β -Carbolin-Vielfalt. Aus Bakterien ist bereits die Pictet-Spenglerase (PS) NscbB aus

Nocardiopsis synnemataformans (Chen, Zhang et al. 2018) sowie McbB aus *Marinactinospora thermotolerans* charakterisiert (Mori, Hoshino et al. 2015). Aus *Chaetomium globosum* ist die bisher einzige pilzliche PS veröffentlicht, für die allerdings noch wichtige Daten zur Charakterisierung auf genetischer Ebene fehlen (Yan, Ge et al. 2014). Gemeinsam haben alle genannten PS, dass Indolalkaloide mit Aldehyden reagieren und mittels PS der Ringschluss am Amin vollzogen wird.

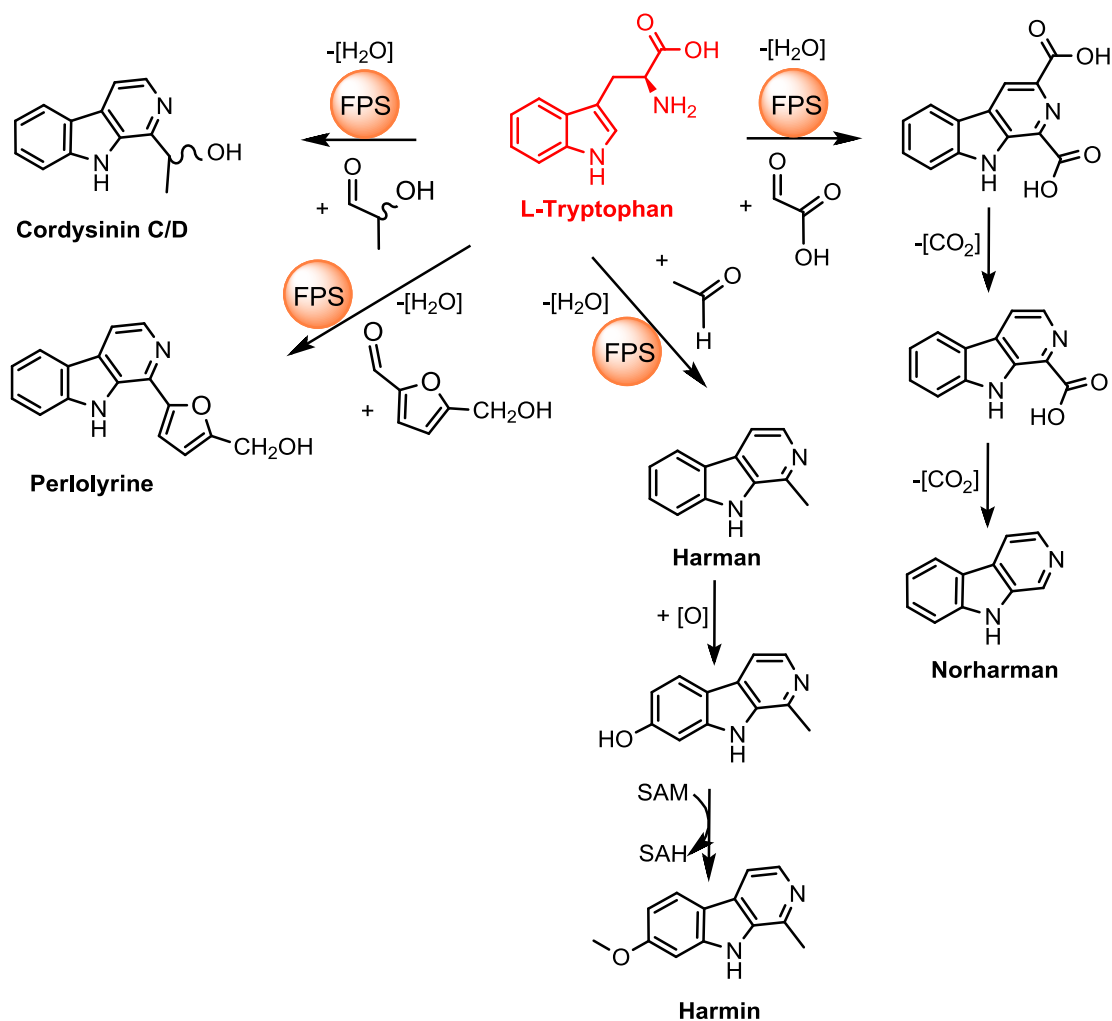


Abbildung 22: Mögliche Biosynthese gefundener β -Carboline mittels pilzlicher Pictet-Spenglerase (FPS)

Im unserem Fall könnte, wie in Abbildung 22 ersichtlich, schon mit vier Aldehyden wie Acetaldehyd oder Glyoxylsäure und L-Tryptophan die β -Carboline Harman und Harmin und Norharman, aus L/D-Lactaldehyd das jeweilige Produkt Cordysinin C/D hergestellt werden. In einer bioinformatischen Suche im Genom von *Psilocybe* nach den vermuteten Genen hinter diesen Reaktionen konnte mit den vorgestellten PS als Modellvorlagen leider kein Biosynthesecuster der β -Carboline gefunden werden. Dies liegt vor allem an fehlenden charakterisierten pilzlichen PS, welche offensichtlich einige Unterschiede zu den bakteriellen PS aufweisen müssen, da selbst deren stark konservierten Bereiche nicht auffindbar war.

Vielleicht liegt auch eine neue Klasse pilzlicher Enzyme vor. Eine weitere Möglichkeit ist ebenso, dass Pilze einen anderen Weg zur Synthese der β -Carboline aus L-Tryptophan entwickelt haben.

Bei der Produktion der unterschiedlichen β -Carboline könnte es sich auch um eine Schutzfunktion gegen Insektenfraß handeln. Ein nicht unwichtiger Faktor ist auch die bisher nicht endgültig geklärte ökologische Funktion der Psilocybin-Produktion und deren vermutete Schutzfunktion gegenüber konkurrierenden Insekten. Aufgrund der hohen Menge von 1-2 % im Trockengewicht, unter Berücksichtigung der nahezu weltweiten Verbreitung der *Psilocybe* Pilze, muss es sich bei dessen Produktion um eine enorm wichtige ökologische Funktion handeln. Harman als MAO_A-Inhibitor und Norharman als MAO_B-Inhibitor sind beide in den Extrakten von *Psilocybe* sp. zu finden und zeigten eine deutliche Wirkung auf das Insekt *Galleria mellonella*. Es wurde eine gesteigerte Serotonin-Konzentration in den Köpfen der Larven nach Verabreichung der Alkaloide gemessen (Wronska, Boguś et al. 2018). Beide β -Carboline inhibierten die Funktion der MAO und es kam zu einer verringerten MAO_A-Konzentrationen in den Köpfen der Larven und zu einer deutlich verzögerten Larvalentwicklung, vermutlich auch durch die Beeinflussung der Serotonin-Konzentrationen (Wrońska, Boguś et al. 2018).

Anhand dieser Ergebnisse schlussfolgern die Autoren auch ohne eine direkte Affinitätsmessung an den Insekten-Rezeptoren, dass die Wirkung von Harman und Norharman auf die zentralen Nervensysteme der Säugetiere ebenso im gleichen Maße die Insekten betrifft. Für eine finale Bestätigung dieser Annahme fehlen allerdings Daten zu den Liganden und Rezeptorinteraktionen der Wirkstoffe in den Insekten. Die geringen Mengen, welche produziert werden, sprechen ebenso für eine Wirkung auf Insekten, welche im Vergleich zur Körpermasse wesentlich mehr Wirkstoffe beim Verzehr dieser Pilze aufnehmen. Dies würde die Annahme von Reynolds bestätigen, in welcher Psilocybin als ein Abwehrstoff gegen pilzfressende Insekten dient (Reynolds, Vijayakumar et al. 2018). Der Mechanismus beruht in diesem Fall ebenso auf einer induzierten Verhaltensmodifizierung durch neuronal aktive Wirkstoffe. Eine gleichzeitige Produktion von MAO_A- und MAO_B-Inhibitoren zusätzlich zum Wirkstoff Psilocybin würde durch die synergistische Natur einerseits die psychotrope Psilocybin-Wirkung deutlich verstärken und fügt andererseits ebenso neue potenzielle Wirkungen der Harman-Alkaloide hinzu. Es ist der bisher erste Nachweis in der Wissenschaft, bei welchem die Produktion eines MAO-Inhibitors den Hauptwirkstoff eines Organismus

verstärkt. Dieses aus den Pilzen bisher völlig unbekannte aber ziemlich effektive Grundkonzept lässt sich im Bereich der Bakterien wiederfinden, es gibt bisher kaum ähnliche bekannte Beispiele dieses synergistischen Prinzips, ein prominentes Beispiel ist die Produktion des β -Lactam Antibiotikums Cephameycin und den β -Lactamase Inhibitor Clavulansäure., wo *Streptomyces clavuligerus* zusätzlich zu dem Antibiotikum Cephameycin den β -Lactamase-Inhibitor Clavulansäure produziert (Paradkar 2013). Dadurch können Antibiotika-Resistenzen vermieden werden, weil die Clavulansäure den Abbau des β -Lactamrings durch β -Lactamasen verhindert.

Für einen Fraßschutz vor Insekten wäre die Kombination aus den synergistischen Wirkstoffen der *Psilocybin* Pilze evolutionär von großem Vorteil und würde die Wirkung bei reduzierter Wirkstoffmenge drastisch verstärken. Bei der von Reynolds (Reynolds, Vijayakumar et al. 2018) angesprochenen Konkurrenz gegen Insekten in den gleichen ökologischen Nischen bietet diese neue Wirkstoffkombination Strategien zur Verteidigung der organischen Nahrungsressourcen für die saprobiontisch lebenden *Psilocybe*-Pilze. Auch Blattschneideameisen in Argentinien wurden dabei beobachtet wie spezialisierte Gruppen über 70 m weit die Fruchtkörper von *P. coprophila* einsammeln und in ihr Nest tragen (Masiulionis, Weber et al. 2013). Da diese Ameisenart bereits eine Kultur des Basidiomyceten *Leucoagaricus* hält, scheint ein Sammeln von *Psilocybe* Fruchtkörpern als Nahrung unwahrscheinlich, und die Autoren vermuten Verteidigungszwecke dahinter. In einer weiteren aktuellen Veröffentlichung wird eine konvergente Entwicklung der Produktion von Psilocybin durch Zikaden parasitierende entomopathogene Pilze der Gattung *Massospora* vorgeschlagen, die das Verhaltens der Zikaden durch die Produktion diverser neuroaktiver Stoffe wie dem Psilocybin beeinflusst (Boyce, Gluck-Thaler et al. 2019).

Die weitere Erforschung der durch *Psilocybe* produzierten β -Carboline hilft hoffentlich bei der Klärung der Fragestellung des Ziels der eigentlichen Produktion von Psilocybin. Außer diesem prominenten Wirkstoff sind noch keine weiteren von Aminosäuren abgeleiteten Naturstoffe aus diesen medizinisch so vielversprechenden *Psilocybe* Arten veröffentlicht worden. So scheint das Metabolom auch 60 Jahre nach der Entdeckung des Psilocybins noch unverstanden und zeigt auf, welchen dringenden Forschungsbedarf die *Psilocybe*-Pilze zukünftig haben, vor allem im Hinblick auf die erhoffte baldige medizinische Anwendung des Wirkstoffes Psilocin oder Psilocybin.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Untersuchung der Biosynthesen von Indolalkaloiden aus den Pilzen der Gattung *Psilocybe*. Dazu zählten unter anderem die erstmalige Charakterisierung der Biosynthese des psychotropen Wirkstoffs Psilocybin und die Entdeckung der gleichzeitigen Produktion einer Vielzahl von β -Carbolinen. Im ersten Schritt wurde dafür das Genom von *P. cyanescens* *de novo* sequenziert und in den Sequenzdaten nach charakteristischen Genen oder Genclustern oder anderen modifizierenden Enzymen gesucht. Nachdem das Psilocybin Biosynthese-Cluster in *Psilocybe* detektiert wurde, konnte dieses heterolog in *E. coli* und *A. niger* exprimiert werden und eine *in vitro*-Charakterisierung der Psilocybin-Biosynthese durchgeführt werden.

Aufgrund des gestiegenen Pharmazeutischen Interesses und der Zusammenarbeit mit der Firma Promega beziehungsweise der non-profit Organisation Usona, wurde eine erweiterte Biokatalytische Route für die *in vitro*-Produktion von Psilocybin entwickelt. Die Lösung war die Entwicklung einer durchgehenden *in vitro*-Synthese durch eine Verknüpfung mit der Tryptophansynthase (TS) mit der Biosyntheseroute des Psilocybins.

Weiterhin konnte die Substratspezifität der TS gegenüber diversen halogenierten Indolen getestet werden und erstmals biokatalytisch mit dem gleichen Satz an Enzymen diverse Analoge wie das Isonorbaeocystin oder Serotonin hergestellt und in dem Magazin Chemistry veröffentlicht werden (Blei, Baldeweg et al. 2018).

Durch einen Austausch mit der TS aus *S. enterica* gelang die Erzeugung eines weiteren Derivates, dem 6-Methylpsilocybin (Fricke, Sherwood et al. 2019). Des Weiteren konnte ebenfalls die Biosynthese des Indolalkaloides L-Hypaphorin mit der Methyltransferase TrpM aus *P. cubensis* charakterisiert werden. Interessanterweise kam es zu keiner Überschneidung zwischen den Substraten von TrpM und PsiM aus der Psilocybin-Biosynthese aufgrund von strikten Substratspezifitäten der jeweiligen Enzyme.

Zusätzlich zu den schon angesprochenen Indolalkaloiden konnten mit meiner Arbeit weitere Naturstoffe aus der Klasse der β -Carboline in den Fruchtkörpern und Mycelien verschiedener *Psilocybe*-Arten nachgewiesen werden. Dies war eine besonders wertvolle Entdeckung im Hinblick auf die möglichen synergistischen Effekte auf die Wirkung des Psilocybins durch die Inhibierung der Monoaminoxidase (Blei, Dörner et al. 2019).

6. Abstract

The goal of this doctoral thesis was the close examination of the biosynthesis of different indole alkaloids produced by different species of the fungal genus *Psilocybe*. This included the first characterization of the biosynthesis of psilocybin as the main psychotropic agent and the first discovery of the simultaneous production of β -carbolines. In the first step, the genome of *P. cyanescens* was sequenced and analyzed for characteristic genes and clusters or modifying enzymes. After the detection of the psilocybin biosynthesis cluster in *Psilocybe*, the cluster was expressed heterologous in *E. coli* and *A. niger* and an *in vitro* characterization of the psilocybin biosynthesis was done.

Because of the raised pharmaceutical interest as well as some collaboration with the company Promega and the non-profit organization Usona, an expanded biocatalytic route for the *in vitro* production of psilocybin was established. The solution was the development of a continuous *in vitro* synthesis through a connection of the tryptophan synthase (TS) out of the basidiomycete *P. cubensis* with the biosynthesis route of psilocybin.

Additionally, the substrate specificity of the TS were tested against different other halogenated indoles and for the first time different analogues of psilocybin could be produced biocatalytically with the same set of enzymes (Blei, Baldeweg et al. 2018).

The generation of another derivative the 6-methylpsilocybin succeeded through an exchange with the TS of *S. enterica* (Fricke, Sherwood et al. 2019). Furthermore, the biosynthesis of the indole alkaloid L-Hypaphorin was characterized using the methyltransferase TrpM. Surprisingly no interference occurred between the substrates of TrpM and the methyltransferase from the psilocybin biosynthesis PsiM because of strict substrate specificities. Supplemental to the already addressed indole alkaloids my work could identify further natural products out of the β -carboline class in the fruiting bodies and mycelia of different *Psilocybe* species. This was a big discovery in regards to the possible synergistic effects this could have on the psychoactive effect of Psilocybin through an inhibition of the monoaminoxidase enzyme (Blei, Dörner et al. 2019).

7. Referenzen

Adelaars, A. "Alles über Psilos: Ein Handbuch der Zauberpilze" Solothurn: Nachtschatten Verlag, (2016).

Ajurell, S. and J. L. Nilsson (1968). "A biosynthetic sequence from tryptophan to psilocybin." Tetrahedron Letters **9**(9): 1063-1064

Ajurell, S. and J. L. Nilsson (1968). "Biosynthesis of psilocybin. II. Incorporation of labelled tryptamine derivatives." Acta Chemica Scandinavica **22**(4): 1210-1218.

Aiello, A., et al. (1987). "Brominated β -carbolines from the marine hydroid *Aglaophenia pluma linnaeus*." Tetrahedron Letters **43**(24): 5929-5932.

Akers, B. P., et al. (2011). "A prehistoric mural in Spain depicting neurotropic *Psilocybe* mushrooms?" Economic Botany **65**(2): 121-128.

Aliev, A. E., et al. (2016). "The structure of tagetitoxin." Organic & Biomolecular Chemistry **14**(1): 238-245.

Allen, J. (2011). "A chemical referral and reference guide to the known species of psilocin and/or psilocybin-containing mushrooms and their published analysis and bluing reactions: an updated and revised list." Researchgate: 1-31.

Allen, J. R. and B. R. Holmstedt (1980). "The simple β -carboline alkaloids." Phytochemistry **19**(8): 1573-1582.

Anderson, K., et al. (1991). "Serine modulates substrate channeling in tryptophan synthase. A novel intersubunit triggering mechanism." Journal of Biological Chemistry **266**(13): 8020-8033.

Arjunan, P., et al. (1996). "Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution." Journal of Molecular Biology **256**(3): 590-600.

Ayer, W. and H. Taube (1972). "Metabolites of *Cyathus helenae*. Cyathin A₃ and allocyathin B₃, members of a new group of diterpenoids." Tetrahedron Letters **13**(19): 1917-1920.

Becher, P. G., et al. (2005). "Nostocarboline: Isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from *Nostoc* 78-12A." Journal of Natural Products **68**(12): 1793-1795.

Blankenfeldt, W. and F. P. Seebeck (2014). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of the ergothioneine-biosynthetic methyltransferase EgtD." Acta Crystallographica **70**: 676-680.

Blei, F., et al. (2018). "Biocatalytic production of psilocybin and derivatives in tryptophan synthase-enhanced reactions." Chemistry—A European Journal **24**(40): 10028-10031.

- Blei, F., et al. (2019). "Simultaneous production of psilocybin and a cocktail of β -carboline monoamine oxidase inhibitors in 'magic' mushrooms." Chemistry—A European Journal **26**(3): 729-734.
- Blei, F., et al. (2018). "Iterative l-tryptophan methylation in *psilocybe* evolved by subdomain duplication." ChemBioChem **19**(20): 2160-2166.
- Bok, J. W. and N. P. Keller (2004). "LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp." Eukaryotic Cell **3**(2): 527-535.
- Bowden, K., et al. (1965). "Constituents of *Amanita muscaria*." Nature **206**(4991): 1359-1360.
- Boyce, G. R., et al. (2019). "Psychoactive plant-and mushroom-associated alkaloids from two behavior modifying cicada pathogens." Fungal Ecology **41**: 147-164.
- Brack, A., et al. (1961). "Tryptophan als biogenetische Vorstufe des Psilocybins." Archiv der Pharmazie **294**(4): 230-234.
- Brondz, I. and K. Høiland (2009). "Biogenesis of Infractine alkaloids in *Cortinarius infractus*. importance of 5-hydroxytryptophane pathway in biogenesis of alkaloids in mushrooms." 5th Conference Nordic Separation Science Society, Estonia: 26-29.
- Brown, D., et al. (1996). "Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(4): 1418-1422.
- Callaway, J. C., et al. (2005). "Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*." Journal of Psychoactive Drugs **37**(2): 145-150.
- Cao, R., et al. (2007). " β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions." Current Medicinal Chemistry **14**(4): 479-500.
- Carod-Artal, F. J. (2015). "Hallucinogenic drugs in pre-columbian mesoamerican cultures." Neurología **30**(1): 42-49.
- Catalfomo, P. and V. Tyler (1964). "The production of psilocybin in submerged culture by *Psilocybe cubensis*." Lloydia **27**(1): 53-63.
- Cerletti, A. (1958). "Etude pharmacologique de la psilocybine." Paris, Muséum national d'Histoire naturelle: 268-271.
- Chen, Q., et al. (2018). "Characterization of a new microbial Pictet-Spenglerase NscbB affording the β -carboline skeletons from *Nocardiopsis synnemataformans* DSM 44143." Journal of Biotechnology **281**: 137-143.

Cooke, M. C. (1902). "Edible and poisonous mushrooms: What to eat and what to avoid." Society for Promoting Christian Knowledge: 89-90.

DeKorne, J. "Psychedelischer Neoschamanismus." Loehrbach: Werner Pieper's MedienXperimente, (1995).

Doblin, R. (1991). "Pahnke's "Good Friday experiment": A long-term follow-up and methodological critique." Journal of Transpersonal Psychology **23**(1): 1-28.

Dörfelt, H. and E. Ruske. "Morphologie der Großpilze: mit 112 Farbbildtafeln, Glossar und Namensregister." Berlin: Springer-Verlag, (2014).

Dunn, M. F., et al. (2008). "Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine." Trends in Biochemical Sciences **33**(6): 254-264.

Erb, T. J., et al. (2017). "Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design." Current Opinion in Chemical Biology **37**: 56-62.

Faulstich, H. (1979). "New aspects of *Amanita* poisoning." Klinische Wochenschrift **57**(21): 1143-1152.

Feldman, E. B. (1998). "Death by chocolate: facts and myths." Nutrition Today **33**(3): 106-112.

Florea, S., et al. (2017). "Ergot alkaloids of the family *Clavicipitaceae*." Phytopathology **107**(5): 504-518.

Fortunato, J. J., et al. (2009). "Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **33**(8): 1425-1430.

Francis, D., et al. (2017). "An engineered tryptophan synthase opens new enzymatic pathways to β -methyltryptophan and derivatives." ChemBioChem **18**(4): 382-386.

Fricke, J., et al. (2019). "Enzymatic route toward 6-methylated baeocystin and psilocybin." ChemBioChem **20**(22): 2824-2829.

Froese, T., et al. (2016). "On the origin of the genus *Psilocybe* and its potential ritual use in ancient Africa and Europe." Economic Botany **70**(2): 103-114.

Gartz, J. (1987). "Vorkommen von Psilocybin und Baeocystin in Fruchtkörpern von *Pluteus salicinus*." Planta Medica **53**(03): 290-291.

Gartz, J. (1989). "Analysis of aeruginascin in fruit bodies of the mushroom *Inocybe aeruginascens*." International Journal of Crude Drug Research **27**(3): 141-144.

Gartz, J. (1989). "Occurrence of psilocybin, psilocin and baeocystin in *Gymnopilus purpuratus*." Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi **14**(1): 19-22.

Gartz, J. (1995). "Cultivation and analysis of *Psilocybe* species and an investigation of *Galerina steglichii*." Annali del Museo Civico di Roverto **10**: 297-306.

Gartz, J. "Magic mushrooms around the world: A scientific journey across cultures and time: the case for challenging research and value systems." Los Angeles: Lis Publications, (1996).

Gaweska, H. and P. F. Fitzpatrick (2011). "Structures and mechanism of the monoamine oxidase family." Biomolecular Concepts **2**(5): 365-377.

Geiger, H. A., et al. (2018). "Dark classics in chemical neuroscience: Psilocybin." American Chemical Society Chemical Neuroscience **9**(10): 2438–2447.

Gerebtzoff, G., et al. (2004). "Halogenation of drugs enhances membrane binding and permeation." ChemBioChem **5**(5): 676-684.

Geyer, M. A. and F. X. Vollenweider (2008). "Serotonin research: contributions to understanding psychoses." Trends in Pharmacological Sciences **29**(9): 445-453.

Ghosal, S. and U. Mazumder (1971). "Alkaloids of the leaves of *Banistereopsis argentea*." Phytochemistry. **10**(11): 2840-2842.

Godfrey, T. and S. West. "Industrial enzymology" New York: Stockton Press, (1996).

Goss, R. J. and P. L. Newill (2006). "A convenient enzymatic synthesis of L-halotryptophans." Chemical Communications (47): 4924-4925.

Goss, R. J. M., et al. (2019). "Heck diversification of indole based substrates under aqueous conditions: from indoles to unprotected halo-tryptophans and halo-tryptophans in a natural and a new to nature natural product." Chemistry—A European Journal. **25**(46): 10866-10875.

Gouzoulis-Mayfrank, E., et al. (1999). "Neurometabolic effects of psilocybin, 3, 4-methylenedioxylethylamphetamine (MDE) and d-methamphetamine in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled PET study with [¹⁸F] FDG." Neuropsychopharmacology **20**(6): 565-581.

Grieshaber, A. F., et al. (2001). "The detection of psilocin in human urine." Journal of Forensic Science **46**(3): 627-630.

Griffiths, R. R., et al. (2006). "Psilocybin can occasion mystical-type experiences having substantial and sustained personal meaning and spiritual significance." Psychopharmacology **187**(3): 268-283

- Gurung, N., et al. (2013). "A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond." BioMed research international **2013**. 1-18
- Gutiérrez, S., et al. (1999). "Gene organization and plasticity of the β -lactam genes in different filamentous fungi." Antonie Van Leeuwenhoek **75**(1): 81-94.
- Guzmán, G. (2009). "The hallucinogenic mushrooms: diversity, traditions, use and abuse with special reference to the genus *Psilocybe*." Fungi from Different Environments: 256-277.
- Guzmán, G. (2012). "New taxonomical and ethnomycological observations on *Psilocybe* (Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetidae, Agaricales, Strophariaceae) from Mexico, Africa and Spain." Acta Botánica Mexicana **100**: 79-106.
- Guzmán, G., et al. (1998). "A Worldwide geographical distribution of the neurotropic fungi, an analysis and discussion." Annali del Museo Civico di Rovereto **14**: 189-280
- Guzmán, G. and M. Castro (2003). "Observations on some known species of *Psilocybe* from Spain and description of a new species." Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid **27**: 181-187.
- Halberstadt, A. L., et al. (2011). "Differential contributions of serotonin receptors to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens in mice." Journal of Psychopharmacology **25**(11): 1548-1561.
- Hanson, J. R. and T. Marten (1973). "Incorporation of [2-³H]-and [4(R)-4-³H]-mevalonoid hydrogen atoms into the sesquiterpenoid illudin M." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **(5)**: 171-172.
- Hasler, F., et al. (2004). "Acute psychological and physiological effects of psilocybin in healthy humans: a double-blind, placebo-controlled dose–effect study." Psychopharmacology **172**(2): 145-156.
- Hemmateenejad, B., et al. (2006). "Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts." Analytica Chimica Acta **575**(2): 290-299.
- Herraiz, T. (2007). "Identification and occurrence of β -carboline alkaloids in raisins and inhibition of monoamine oxidase (MAO)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(21): 8534-8540.
- Herraiz, T., et al. (2010). " β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO)." Food and Chemical Toxicology **48**(3): 839-845.
- Hoefgen, S., et al. (2018). "Facile assembly and fluorescence-based screening method for heterologous expression of biosynthetic pathways in fungi." Metabolic Engineering **48**: 44-51.
- Hofmann, A. "Psychotomimetic agents." New York: Dekker ,(1968).

Hofmann, A. "LSD, my problem child: reflections on sacred drugs, mysticism, and science." New York: McGraw-Hill Book Company: (1980).

Hofmann, A., et al. (1958). "Konstitutionsaufklärung und Synthese von Psilocybin." Experientia **14**(11): 397-399.

Hofmann, A., et al. (1958). "Psilocybin, a psychotropic substance from the Mexican mushroom *Psilocybe mexicana* Heim." Experientia **14**(3): 107-109.

Hollister, L. E. (1961). "Clinical, biochemical and psychologic effects of psilocybin." Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie **130**: 42.

Hopf, A. and H. Eckert (1974). "Distribution patterns of 14-C-psilocin in the brains of various animals." Activitas Nervosa Superior **16**(1): 64-66.

Ichinose, H. and T. Kitaoka (2018). "Insight into metabolic diversity of the brown-rot basidiomycete *Postia placenta* responsible for sesquiterpene biosynthesis: semi-comprehensive screening of cytochrome P450 monooxygenase involved in protoilludene metabolism." Microbial Biotechnology **11**(5): 952-965.

Jaeger, R. J., et al. (2013). "HR-MALDI-MS imaging assisted screening of β -carboline alkaloids discovered from *Mycena metata*." Journal of Natural Products **76**(2): 127-134.

Jensen, N., et al. (2006). "Aeruginascin, a trimethylammonium analogue of psilocybin from the hallucinogenic mushroom *Inocybe aeruginascens*." Planta Medica **72**(07): 665-666.

Johnson, M. W. and R. R. Griffiths (2017). "Potential therapeutic effects of psilocybin." Neurotherapeutics **14**(3): 734-740.

Johnson, M. W., et al. (2008). "Human hallucinogen research: guidelines for safety." Journal of Psychopharmacology **22**(6): 603-620.

Jones, P. A. (2002). "DNA methylation and cancer." Oncogene **21**(35): 5358-5360.

Kalač, P. (2009). "Chemical composition and nutritional value of european species of wild growing mushrooms: A review." Food Chemistry **113**(1): 9-16.

Kalb, D., et al. (2016). "Active-site engineering expands the substrate profile of the basidiomycete L-tryptophan decarboxylase CsTDC." Chembiochem **17**(2): 132-136.

Kavanagh, F., et al. (1951). "Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **37**(9): 570.

- Kim, H., et al. (1997). "Inhibition of monoamine oxidase A by β -carboline derivatives." Archives of Biochemistry and Biophysics **337**(1): 137-142.
- Kobayashi, J., et al. (1990). "Eudistomidins B, C, and D: novel antileukemic alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*." The Journal of Organic Chemistry **55**(11): 3666-3670.
- Kobayashi, J., et al. (1984). "Eudistomins A, D, G, H, I, J, M, N, O, P, and Q, bromo, hydroxy, pyrrolyl and iminoazepino β -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*." Journal of the American Chemical Society **106**(5): 1526-1528.
- Koshcheenko, K., et al. (1977). "Hydroxylation of indolyl-3-acetic acid by the fungus *Aspergillus niger* IBFM-F-12." Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya **13**(2): 248-254.
- Krebs, T. S. and P.-Ø. Johansen (2013). "Over 30 million psychedelic users in the United States." F1000Research **2**(98): 1-5.
- Kriegsteiner, G. J. "Grosspilze Baden-Württembergs." Stuttgart: Eugen-Ulmer, (2000).
- Kucht, S., et al. (2004). "Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides." Planta **219**(4): 619-625.
- Labate, B. C. and H. Jungaberle. "The internationalization of ayahuasca." Münster: Lit Verlag, (2011)
- Lake, R., et al. (1989). "Eudistomins from the New Zealand ascidian *Ritterella sigillinoides*." Australian Journal of Chemistry **42**(7): 1201-1206.
- Lenz, C., et al. (2019). "Injury-triggered blueing reactions of *Psilocybe* "magic" mushrooms." Angewandte Chemie International Edition **59**(4) : 1450-1454
- Lenz, C., et al. (2017). "Identification of ω -N-methyl-4-hydroxytryptamine (norpsilocin) as a *Psilocybe* natural product." Journal of Natural Products **80**(10): 2835-2838.
- Leung, A. and A. Paul (1968). "Baeocystin and norbaeocystin: New analogs of psilocybin from *Psilocybe baeocystis*." Journal of Pharmaceutical Sciences **57**(10): 1667-1671.
- Li, D., et al. (2017). "Methods for genetic transformation of filamentous fungi." Microbial Cell Factories **16**(168): 1-13
- Li, Y., et al. (2014). "Current and emerging options for taxol production. Biotechnology of isoprenoids." Springer-Verlag: 405-425.
- Lindequist, U., et al. (2005). "The pharmacological potential of mushrooms." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2**(3): 285-299.

Liu, T., et al. (1988). "Perlolyrine: a β -carboline alkaloid from *Codonopsis pilosula*." Planta Medica **54**(05): 472-473.

Lu, Y., et al. (2009). "Halogen bonding a novel interaction for rational drug design?" Journal of Medicinal Chemistry **52**(9): 2854-2862.

Luo, X., et al. (2019). "Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast." Nature **567**(7746): 123-126

Lyko, F. and R. Brown (2005). "DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies." Journal of the National Cancer Institute **97**(20): 1498-1506.

MacLean, K. A., et al. (2011). "Mystical experiences occasioned by the hallucinogen psilocybin lead to increases in the personality domain of openness." Journal of Psychopharmacology **25**(11): 1453-1461.

Mahajan, G. B. and L. Balachandran (2012). "Antibacterial agents from actinomycetes-a review." Frontiers in Bioscience (Elite Edition) **4**(4): 240-253.

Manevski, N., et al. (2010). "Glucuronidation of psilocin and 4-hydroxyindole by the human UDP-glucuronosyltransferases." Drug Metabolism and Disposition **38**(3): 386-395.

Masiulionis, V. E., et al. (2013). "Foraging of *Psilocybe* basidiocarps by the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* in Santa Fé, Argentina." SpringerPlus **2**(1): 1-4

Matyášová, E., et al. (2011). "Production of morphine and variability of significant characters of *Papaver somniferum* L." Plant, Soil and Environment **57**(9): 423-428.

Mayer, A., et al. (1999). "*In-vitro* and *in-vivo* nematocidal activities of the cyclic dodecapeptide omphalotin A." Pesticide Science **55**(1): 27-30.

McMorris, T. and M. Anchel (1965). "Fungal metabolites. The structures of the novel sesquiterpenoids illudin-S and -M." Journal of the American Chemical Society **87**(7): 1594-1600.

Metzner, R. "Sacred mushroom of visions: Teonanacatl: A sourcebook on the psilocybin mushroom." New York: Simon and Schuster, (2005).

Meyer, V., et al. (2003). "Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*." Current Genetics **43**(5): 371-377.

Michielse, C. B., et al. (2005). "*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi." Current Genetics **48**(1): 1-17.

Miller, M. J., et al. (2019). "Chemical evidence for the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **116**(23): 11207-11212.

Miralles, A., et al. (2005). "High-affinity binding of β -carbolines to imidazoline I2B receptors and MAO-A in rat tissues: norharman blocks the effect of morphine withdrawal on DOPA/noradrenaline synthesis in the brain." European Journal of Pharmacology **518**(2-3): 234-242.

Moloudizargari, M., et al. (2013). "Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids." Pharmacognosy Reviews **7**(14): 199-212.

Mori, T., et al. (2015). "Structural basis for β -carboline alkaloid production by the microbial homodimeric enzyme McbB." Chemistry & Biology **22**(7): 898-906.

Mosnaim, A. D., et al. (2014). "Analgesic effects of β -phenylethylamine and various methylated derivatives in mice." Neurochemical Research **39**(9): 1675-1680.

Naranjo, C. (1967). "Psychotropic properties of the harmala alkaloids." Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs **1645**: 385-391.

Naumenko, V. S., et al. (2014). "Interplay between Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ Receptors in Depressive Disorders." CNS Neuroscience & Therapeutics **20**(7): 582-590.

Nichols, D. E. (2004). "Hallucinogens." Pharmacology & Therapeutics **101**(2): 131-181.

Oda, Y., et al. (1988). "Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria." Mutation Research Letters **208**(1): 39-44.

Ozawa, M., et al. (2008). "Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**(14): 3992-3994.

Paddon, C. J., et al. (2013). "High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin." Nature **496**(7446): 528-532.

Palaniappan, N., et al. (2003). "Enhancement and selective production of phoslactomycin B, a protein phosphatase IIa inhibitor, through identification and engineering of the corresponding biosynthetic gene cluster." Journal of Biological Chemistry **278**(37): 35552-35557.

Paradkar, A. (2013). "Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: biogenesis, regulation and strain improvement." The Journal of Antibiotics **66**(7): 411-420.

Pardo, J., et al. (1985). "Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*--the producing organism." Journal of General Microbiology **131**(6): 1289-1298.

Passie, T., et al. (2002). "The pharmacology of psilocybin." Addiction Biology **7**(4): 357-364.

- Peden, N. and S. Pringle (1982). "Hallucinogenic fungi." The Lancet **319**(8268): 396-397.
- Perkin, W. H. and R. Robinson (1919). "LXXIX.—Harmine and harmaline. Part III." Journal of the Chemical Society **115**: 933-967.
- Polanski, W., et al. (2011). "Stimulation, protection and regeneration of dopaminergic neurons by 9-methyl- β -carboline: a new anti-Parkinson drug? Expert Review of Neurotherapeutics." Expert Review of Neurotherapeutics **11**(6): 845-860.
- Pratt, M. L. and J. DeMoss (1988). "*Neurospora* tryptophan synthase. Characterization of the pyridoxal phosphate binding site." Journal of Biological Chemistry **263**(14): 6872-6876.
- Raboni, S., et al. (2009). "Tryptophan synthase: a mine for enzymologists." Cellular and Molecular Life Sciences **66**(14): 2391-2403.
- Ray, T. S. (2010). "Psychedelics and the human receptorome." PloS One **5**(2): e9019.
- Repke, D. B., et al. (1977). "Baeocystin in *psilocybe*, *conocybe* and *panaeolus*." Lloydia **40**(6): 566-578.
- Reynolds, H. T., et al. (2018). "Horizontal gene cluster transfer increased hallucinogenic mushroom diversity." Evolution Letters **2**(2): 88-101.
- Rinehart, K. L., et al. (1984). "Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*." Journal of the American Chemical Society **106**(5): 1524-1526.
- Rohde, L. A. H., et al. (2012). "Intersubunit Bridge Formation Governs Agonist Efficacy at Nicotinic Acetylcholine $\alpha 4\beta 2$ Receptors Unique role of halogen bonding revealed." Journal of Biological Chemistry **287**(6): 4248-4259.
- Rokas, A., et al. (2018). "The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi." Nature Reviews Microbiology **16**(12): 731-744.
- Rosewich, U. L. and H. C. Kistler (2000). "Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi." Annual Review of Phytopathology **38**(1): 325-363.
- Ruiz-Díez, B. (2002). "Strategies for the transformation of filamentous fungi." Journal of Applied Microbiology **92**(2): 189-195.
- Sahagún, B. "Psalmodia christiana, y sermonario de los sanctos del año, en lengua mexicana " Mexico City: Pedro Ocharte (1583)
- Samorini, G. (1999). "Nuevas fronteras de la etnomicología." Colección Cogniciones, Barcelona, 51-80.

Samorini, G. (2001). "New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms." International Journal of Medicinal Mushrooms **3**(2-3): 257-278.

Schrettl, M., et al. (2010). "Self-protection against gliotoxin—a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, GliT, completely protects *Aspergillus fumigatus* against exogenous gliotoxin." PLoS Pathogens **6**(6): e1000952.

Schultes, R. E. and A. Hofmann. "Plants of the gods: origins of hallucinogenic use." New York: McGraw-Hill (1979).

Shellard, E. (1974). "The alkaloids of *Mitragyna* with special reference to those of *Mitragyna speciosa*, Korth." Bulletin on Narcotics **26**(2): 41-55.

Sherwood, A. M. and T. E. Prisinzano (2018). "Novel psychotherapeutics—a cautiously optimistic focus on Hallucinogens". Expert Review of Clinical Pharmacology **11**(1): 1-3

Skrzynia, C., et al. (1989). "Molecular characterization of TRP1, a gene coding for tryptophan synthetase in the basidiomycete *Coprinus cinereus*." Gene **81**(1): 73-82.

Slonczewski, J. L. and J. W. Foster. "Mikrobiologie: eine Wissenschaft mit Zukunft." Heidelberg: Springer Spektrum (2012).

Slot, J. C. (2017). "Fungal gene cluster diversity and evolution." Advances in Genetics Elsevier. **100**: 141-178.

Smith, D. R., et al. (2014). "The first one-pot synthesis of L-7-iodotryptophan from 7-iodoindole and serine, and an improved synthesis of other L-7-halotryptophans." Organic Letters **16**(10): 2622-2625.

Stachel, S. J., et al. (1999). "The fluorescence of scorpions and cataractogenesis." Chemistry & Biology **6**(8): 531-539.

Stahlschmidt, C. (1877). "Über eine neue in der Natur vorkommende organische Säure." Justus Liebigs Annalen der Chemie **187**(2-3): 177-197.

Steffen-Munsberg, F., et al. (2013). "Connecting unexplored protein crystal structures to enzymatic function." ChemCatChem **5**(1): 150-153.

Stijve, T., et al. (1985). "Occurrence of psilocybin and baeocystin in the genus *Inocybe* (Fr.) Fr." Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi **12**(4): 469-473.

Tang, G.-H., et al. (2001). "Inhibitory effect on platelet aggregation and anti-thrombotic effect of perlolyrine and its analogues." Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology **15**(4): 317-319.

Tascon, M., et al. (2017). "Parts-per-trillion detection of harmala alkaloids in *Undaria pinnatifida* algae by on-line solid phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **954**: 60-67.

Teichert, A. "Chemische und biologische Untersuchungen von Inhaltsstoffen aus Pilzfruchtkörpern der Gattungen *Cortinarius* und *Hygrophorus*." Wittenberg: Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität (2008).

Teichert, A., et al. (2008). "Determination of β -carboline alkaloids in fruiting bodies of *Hygrophorus* spp. by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry." Phytochemical Analysis **19**(4): 335-341.

Theßeling, A., et al. (2019). "Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism." Nature Communications **10**(1): 1-7.

Thörner, W. (1878). "Über einen in einer *Agaricus*-Art vorkommenden chinonartigen Körper." Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft **11**(1): 533-535.

Torrens-Spence, M. P., et al. (2014). "Investigation of a substrate-specifying residue within *Papaver somniferum* and *Catharanthus roseus* aromatic amino acid decarboxylases." Phytochemistry **106**: 37-43.

Tylš, F., et al. (2014). "Psilocybin—summary of knowledge and new perspectives." European Neuropsychopharmacology **24**(3): 342-356.

Uchida, K., et al. (2006). "Total synthesis of (\pm)-morphine." Organic Letters **8**(23): 5311-5313.

Usdin, E. and D. H. Efron (1972). "Psychotropic drugs and related compounds, National Institute of Mental Health. " **72**(9074): 1-790

Van Amsterdam, J., et al. (2011). "Harm potential of magic mushroom use: a review." Regulatory Toxicology and Pharmacology **59**(3): 423-429.

Vit, A., et al. (2015). "Ergothioneine biosynthetic methyltransferase EgtD reveals the structural basis of aromatic amino acid betaine biosynthesis." ChemBiochem **16**(1): 119-125.

Wakimoto, T., et al. (2014). "Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont." Nature Chemical Biology **10**(8): 648-655.

Wasson, R. G. (1957). "Seeking the magic mushroom." Life **42**(19): 100-120.

Westfall, P. J., et al. (2012). "Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(3): E111-E118.

- Wolf, D. H. and M. Hoffmann (1974). "Tryptophan synthase from yeast: Purification by affinity chromatography, physical properties." European Journal of Biochemistry **45**(1): 269-276.
- Wrońska, A. K., et al. (2018). "Harman and norharman, metabolites of entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales), disorganize development of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) and affect serotonin-regulating enzymes." PloS One **13**(10): e0204828.
- Wu, J., et al. (2011). "Toward improvement of erythromycin A production in an industrial *Saccharopolyspora erythraea* strain via facilitation of genetic manipulation with an artificial attB site for specific recombination." Applied and Environmental Microbiology **77**(21): 7508-7516.
- Wu, M., et al. (2013). "Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*." Journal of Biological Chemistry **288**(18): 12828-12839.
- Xu, Z., et al. (2014). "Halogen bond: its role beyond drug–target binding affinity for drug discovery and development." Journal of Chemical Information and Modeling **54**(1): 69-78.
- Yan, W., et al. (2014). "Pictet–Spengler reaction-based biosynthetic machinery in fungi." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(51): 18138-18143.
- Yang, M.-L., et al. (2011). "Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis*." Journal of Natural Products **74**(9): 1996-2000.
- Zhang, C., et al. (2019). "Design of novel dopamine D2 and serotonin 5-HT_{2A} receptors dual antagonists toward schizophrenia: An integrated study with QSAR, molecular docking, virtual screening and molecular dynamics simulations." Journal of Biomolecular Structure and Dynamics **38**(3): 1-26.
- Zheng, Y.-M., et al. (2017). "Development of a versatile and conventional technique for gene disruption in filamentous fungi based on CRISPR-Cas9 technology." Scientific Reports **7**(1): 1-10.
- Zhu, S., et al. (2016). "Insights into the unique phosphorylation of the lasso peptide paeninodin." Journal of Biological Chemistry **291**(26): 13662-13678.
- Zimmerman, S., et al. (1987). "Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity." The Journal of Antibiotics **40**(12): 1677-1681.

8. Abkürzungsverzeichnis

[M+H] +	positiv geladenes Ion der Masse M +1
[M-H] -	positiv geladenes Ion der Masse M -1
aa	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
C	Kohlenstoff
C4	vierter Kohlenstoff
C6	sechster Kohlenstoff
EKG	Elektrokardiogramm
HPLC	High-performance liquid chromatography
HR-MS	High-resolution mass spectrometry
LD ₅₀	Letale Dosis 50 Prozent
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
MAO	Monoaminoxidase
MS	Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
NMR	Kern-Magnetresonanz (Nuclear magnetic resonance)
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase-chain-reaction)
PLP	Pyridoxalphosphat
PKS	Polyketidsynthase
PKS-NRPS	Polyketidsynthase-Nichtribosomale Peptidsynthetase-Hybrid
SAH	S-Adenosyl-Homocysteine
SAM	S-Adenosyl-Methionein
TS	Tryptophan Synthase
TDC	Tryptophan Decarboxylase
UV	Ultraviolett

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prähistorische Darstellungen psychedelischer Pilze

Abbildung 2: Weitere prähistorische Darstellungen psychedelischer Pilze

Abbildung 3: Struktur des Psilocybins

Abbildung 4: Verschiedene *Psilocybe* Arten

Abbildung 5: Charakteristische Merkmale von *Psilocybe*

Abbildung 6: Mikroskopie der Sporen verschiedener *Psilocybe* Arten

Abbildung 7: Struktur des Psilocybins verglichen mit anderen Naturstoffen

Abbildung 8: Fruchtkörperbildung durch *P. cubensis*

Abbildung 9: Naturstoffe aus Pilzen

Abbildung 10: Umsatz von Indol und Serin zu Tryptophan mittels TS

Abbildung 11: Bisher aktueller Biosyntheseweg des Psilocybins nach Agurell und Nilsson

Abbildung 12: Unterschiedliche aus Organismen isolierte β -Carboline

Abbildung 13: Gefundene Biosynthese-Enzyme in *P. cyanescens* und *P. cubensis*

Abbildung 14: Die neue Biosynthese-Route des Psilocybins

Abbildung 15: Schematische Darstellung der biokatalytischen Herstellung von Psilocybin und Derivaten

Abbildung 16: Neue Biosynthese-Wege für Isonorbaeocystin, Psilocybin und Serotonin

Abbildung 17: Die Strukturformeln des Morphins aus *Papaver somniferum* und Paclitaxel aus *Taxus brevifolia*

Abbildung 18: Schrittweise Methylierung von Tryptophan mittels TrpM

Abbildung 19: Gemeinsamer Vorläufer für die Produktion unterschiedlicher Indolalkaloide aus Pilzen

Abbildung 20: Extraktion von verschiedenen *Psilocybe* Arten und die Fluoreszenz der aufgereinigten Extrakte

Abbildung 21: In *Psilocybe* sp. gefundene β -Carboline

Abbildung 22: Die Biosynthese der β -Carboline

10. Publikationen

- **Enzymatic synthesis of psilocybin**

Janis Fricke*, **Felix Blei***, Dirk Hoffmeister

Angewandte Chemie Internationale Edition, Band 56, Seiten 12352-12355, 2017

Angewandte Chemie, Band 129, Ausgabe 40, Seiten 12524-12527, 2017

- **Biocatalytic production of psilocybin and derivatives in L-tryptophan-synthase enhanced reactions**

Felix Blei, Janis Fricke, Florian Baldeweg, Dirk Hoffmeister

Chemistry - A European Journal, Band 24, Ausgabe 40, Seiten 10028-10031, 2018

- **Iterative L-tryptophan methylation in *Psilocybe* evolved by subdomain duplication**

Felix Blei, Janis Fricke, Jonas Wick, Jason C. Slot, Dirk Hoffmeister

Chembiochem, Band 19, Ausgabe 20, Seiten 2160-2166, 2018

- **Enzymatic production of 6-methylated baeocystin and psilocybin**

Janis Fricke, Alexander Sherwood, Robert Kargbo, Andrew Orry, **Felix Blei**, Andreas Naschberger, Bernhard Rupp, Dirk Hoffmeister

Chembiochem, Band 20, Ausgabe 22, Seiten 2824-2829, 2019

- **Simultaneous production of psilocybin and β -carboline monoamine oxidase inhibitors in 'magic mushrooms'**

Felix Blei*, Sebastian Dörner*, Janis Fricke, Florian Baldeweg, Felix Trottmann, Anna Komor, Florian Meyer, Christian Hertweck, Dirk Hoffmeister

Chemistry - A European Journal, Band 26, Ausgabe 3, Seiten 729-734, 2020

- **Production options for psilocybin: Making of the magic**

Janis Fricke, Claudius Lenz, Jonas Wick, **Felix Blei**, Dirk Hoffmeister

Chemistry - A European Journal, Band 25, Ausgabe 4, Seiten 897-903, 2019

Anteilsverteilung der Autoren an den Publikationen

Fricke J, **Blei F**, Hoffmeister D (2017) *Enzymatic synthesis of psilocybin*. Angewandte Chemie und Internationale Edition.

Janis Fricke Klonierung, Proteinproduktion und –Charakterisierung, Analysen

Felix Blei Klonierung, Proteinproduktion und -Charakterisierung, Analysen

Dirk Hoffmeister Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Blei F, Baldeweg F, Fricke J, Hoffmeister D (2018) *Biocatalytic production of psilocybin and derivatives in tryptophan synthase-enhanced reactions*. Chemistry – A European Journal.

Felix Blei Klonierung, Proteinproduktion und -Charakterisierung, Analysen

Janis Fricke Gelfiltration, zusätzliche Proteincharakterisierung

Florian Baldeweg Auswertung NMR-Messungen

Dirk Hoffmeister Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Blei F, Fricke J, Wick J, Slot JC, Hoffmeister D (2018) *Iterative L-tryptophan methylation in Psilocybe evolved by sub-domain duplication*. ChemBioChem.

Felix Blei Klonierung, Proteinproduktion und -Charakterisierung

Janis Fricke Gelfiltration, zusätzliche Proteincharakterisierung

Jonas Wick Extraktion und Analytik (HPLC-HRMS) der Extrakte aus *Psilocybe*

Jason C. Slot Phylogenetische Untersuchungen

Dirk Hoffmeister Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Fricke J, Sherwood A, Kargbo R, Orry A, **Blei F**, Naschberger A, Rupp B, Hoffmeister D (2019) *Enzymatic route toward 6-methylated baeocystin and psilocybin*. ChemBioChem.

Janis Fricke Proteinproduktion und –Charakterisierung, Enzymassays

Alexander Sherwood Beitrag zum Manuskripttext

Robert Kargbo Beitrag zum Manuskripttext

Andrew Orry *in silico* Modellierung

Felix Blei Aufreinigung Produkt und NMR-spektroskopische Untersuchungen

Andreas Naschberger *in silico* Modellierung und Analyse, Beitrag zum Manuskripttext

Bernhard Rupp *in silico* Modellierung und Analyse, Beitrag zum Manuskripttext

Dirk Hoffmeister Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Blei F, Dörner, S, Fricke S, Baldeweg F, Trottmann F, Komor A, Meyer F, Hertweck C, Hoffmeister D (2019) *Simultaneous production of psilocybin and a cocktail of β -carboline monoamine oxidase inhibitors in ‘magic’ mushrooms*. Chemistry – A European Journal.

Felix Blei Extraktion und Identifikation der β -Carboline

Sebastian Dörner Synthese einiger β -Carboline

Janis Fricke Fütterungsexperimente und Konzentrationsbestimmungen

Florian Baldeweg Auswertung NMR-spektroskopische Untersuchungen

Felix Trottmann Anfertigen und Auswerten der MALDI Messungen

Anna Komor Anfertigen und Auswerten der MALDI Messungen

Florian Meyer FPLC Analytik

Christian Hertweck Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Dirk Hoffmeister Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Fricke J, Lenz C, Wick J, **Blei F**, Hoffmeister D (2019) *Production options for psilocybin - The making of the magic*. Chemistry – A European Journal.

Janis Fricke Erstellung der Grafiken und Beitrag zum Manuskripttext

Claudius Lenz Erstellung der Grafiken und Beitrag zum Manuskripttext

Jonas Wick Beitrag zum Manuskripttext

Felix Blei Beitrag zum Manuskripttext

Dirk Hoffmeister Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

11. Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema: „Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden aus den Basidiomyceten der Gattung *Psilocybe*“ Selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt. Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind in der Danksagung der Dissertation oder den entsprechenden Manuskripten genannt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Auch haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, erhalten. Die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form von mir noch nicht als Arbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht worden.

Jena, den

Felix Blei

12. Danksagung

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Doktorvater Prof. Hoffmeister für die Chance und das Vertrauen zur Durchführung dieser Doktorarbeit. Besonders hervorheben möchte ich seine allzeit offene Tür und Zeit, die er in mich investiert hat. Weiterhin für das Wissen und Fähigkeiten die er mir persönlich vermittelt hat, sowie der Chance auch eigene Forschungsideen zu verfolgen und diese zu unterstützen. Die Promotionszeit hat mich als Mensch und Wissenschaftler positiv geprägt und weiterentwickelt.

Ich danke auch meiner gesamten Arbeitsgruppe, welche mir bei meiner Forschung auch in komplizierten Zeiten geholfen hat. Besonders erwähnen möchte ich die gute und enge Zusammenarbeit und Freundschaft mit meinen Kollegen Janis Fricke, Sebastian Dörner, Florian Baldeweg sowie Claudius Lenz und Jonas Wick.

Ein großes Dankeschön geht ebenso an das Hans-Knöll-Institut Jena, für die Möglichkeiten der guten Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe, welche sich als essenziell für meine Forschungen herausgestellt haben. Eine besondere Erwähnung verdienen hier Andrea Perner und Heike Heinecke für die jahrelange freundschaftliche Zusammenarbeit und die Messungen meiner vielen HRMS bzw. NMR-Proben.

Eine große Unterstützung während der ganzen Promotionszeit war und ist für mich meine langjährige Lebensgefährtin Tina Schache. Vielen Dank für deine emotionale Unterstützung in den schwierigen Phasen der Promotion, dein offenes Ohr auch für verwirrende Fachgespräche, welche sicher nicht immer einfach nachzuvollziehen sind. Vielen Dank, dass du ein Teil meines Lebens bist! Dankeschön auch für das ständige Korrekturlesen meiner Arbeitsberichte und der Dissertation selbst.

Danken möchte ich auch dem Rocket Jena für die Möglichkeit der Finanzierung meines Studiums und für all die Erfahrungen als Barchef die ich während dieser Zeit sammeln konnte.

Für das Durchlesen und Kommentieren meiner Promotionsarbeit möchte ich mich besonders bei Janis Fricke, Dr. Christoph Enzensberger, Dr. Markus Greßler, Elvira Laukus, sowie Tim Schäfer bedanken.